

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİNKONUN KARACİĞER FİBROZU ÜZERİNDEKİ GENETİK VE EPİGENETİK
ETKİSİ

Zeynep Büşra Aksoy

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. K. Can Akçalı

Ocak

2019

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Zeynep Büşra Aksoy

İmzası

ONAY

Prof. Dr. K. Can Akçalı danışmanlığında Zeynep Büşra Aksoy tarafından hazırlanan bu çalışma 11 Ocak 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. K. Can Akçalı

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

İmza:

Üye: Prof. Dr. İhsan GÜRSEL

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut Özkul

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Çinkonun Karaciğer Fibrozu Üzerindeki Genetik ve Epigenetik Etkisi

Zeynep Büşra Aksoy

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. K. Can Akçalı

Karaciğer fibrozisi, fazla miktarda ekstrasellüler matriks bileşenlerinin birikmesi ile oluşan anormal yara iyileşmesi durumudur. Karaciğer fibrozu geri döndürülebilir bir süreç olmasının yanında eğer müdahale edilmezse önce siroz ardından hepatosellüler karsinoma oluşumu ile sonlanabilmektedir. Karaciğer fibrozu ve hepatoma hastalarının serumlarında çinko eksikliği yaygın görülmektedir. Çinkonun insan genomunda bulunan tüm proteinlerin %15'ine bağlanarak bu proteinleri aktive ettiği bilinmektedir. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar çinkonun karaciğer fibrozisi üzerinde olumlu etkisi olduğunu göstermiştir. Bu durumda çinkonun anti-fibrotik mekanizmasının genetik ve epigenetik düzeyde kontrol edildiğini düşünmekteyiz.

Bu tez çalışmasında hücre içi eser element olan çinkonun karaciğer fibrozisi gelişimi üzerindeki etki mekanizması ile hepatoma hücreleri üzerindeki etkisi in vitro deneylerle araştırılmıştır. Fibrotik hücre modeli olarak insan karaciğer stellat hücre hattı olan LX2, siroz menşeli hepatoma hattı olarak da Hep40 kullanılmıştır. Yapılan deneylerde hücrelere verilen çinkonun, Zip/ZnT gibi çinko taşıyıcı kanal proteinlerinin hem protein hem de mRNA düzeyindeki ifade seviyelerini etkilediği gösterilmiştir. Buna bağlı olarak hücre içi çinko miktarının ayarlanmasıyla birlikte etkilenen MT1, MT2, MMP2 ve MMP13 genlerindeki ifade değişikliklerinin epigenetik olarak kontrol mekanizmaları çalışılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinin ardından hücre çinkonun fibrotik hücreler ve hepatoma hücreleri üzerindeki olumlu etkisinin genetik ve epigenetik mekanizmalarla kontrol edildiği gösterilmiştir.

2019, 82 sayfa

Anahtar kelimeler: Çinko, karaciğer fibrozu, hepatosellüler karsinoma, Zip/ZnT, HDAC4

ABSTRACT

MSc Thesis

The Genetic Effects of Zinc on Liver Fibrosis

Zeynep Büşra Aksoy

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. K. Can Akçalı

Liver fibrosis is resulted from unusual extracellular matrix accumulation due to the factors that lead liver injury. Liver fibrosis is reversible, however, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma might develop without any treatment attempt. The 15% of proteins in human genome are activated by zinc. It is known that zinc deficiency in patient serum is a common symptom of both liver fibrosis and hepatoma. Previous studies show that zinc has positive effects on both fibrotic and cancer cells. In this study, we try to understand the genetic and epigenetic role of zinc as a trace element in injured hepatic cell lines. We used LX2 cell line as the fibrotic cell model and Hep40 was used as the hepatocellular carcinoma cell line. MTF-1 transcription factor is known to be a zinc-activated protein and it regulates MT and MMP genes' transcription in order to maintain cellular zinc homeostasis. MTF-1 needs MRE consensus sequence at the promotor region of the gene for DNA binding. We found that Zip7, Zip8, Zip14, and ZnT7 channel proteins have MRE sequence and we investigated that whether their expression levels are regulated by MTF-1 or not. Also, we try to understand the epigenetic effect of zinc on MT and MMP expressions by studying with HDAC4 and its action on those genes.

As a result of our study, we found that Zip7, Zip8, Zip14, and ZnT7 channel proteins are regulated by MTF-1. Their expression levels are affected from intracellular zinc concentration. Also, HDAC4 binds to MT1, MT2, MMP2, and MMP13 genes but it does not repress their expression after the zinc treatment as zinc directly affects their expression.

2019, 82 pages

Key words: Zinc, liver fibrosis, hepatocellular carcinoma, Zip/ZnT, HDAC4

TEŞEKKÜR

Daniőman hocam Prof. Dr. K. Can Akçalı'ya öncelikle hem lisansım sırasında hem de yüksek lisans çalıőmam boyunca engin birikimiyle yol gösterdiği, sonuna kadar destek olduğu ve bana olan güvenini her zaman hissettirdiği için çok teşekkür ederim.

Dr. C. Verda Bitirim'e tecrübelerini hiç sakınmadan paylaőtıđı için, daimî desteği ile kendime olan güvenimi arttırdığı ve mesleki olarak kazandırdığı her őey için teşekkür ederim.

Sonsuz tecrübesi ile tez çalıőmamın őekillenmesindeki etkisi ve tüm yardımları için Prof. Dr. Belma Turan'a, Doç. Dr. Erkan Tuncay'a ve Dr. Yusuf Olđar'a destek ve yardımlar için çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi manevi hiçbir őeyi esirgemeyen, daima yanımda olan aileme, hayatta kendimi őanslı hissetme sebebim olan Kemal Özer'e verdikleri tüm destek ve sevgi için, son olarak yanımda olduğu her an için kedim Müfit'e teőekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

<u>ETİK BEYAN</u>	<u>i</u>
<u>ÖZET</u>	<u>iii</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>iv</u>
<u>TEŞEKKÜR</u>	<u>v</u>
<u>1. GİRİŞ</u>	<u>1</u>
<u>2. KURAMSAL TEMELLER</u>	<u>2</u>
2.1. KARACİĞER	2
2.1.1. KARACİĞER FİBROZU	3
2.1.2. ÇİNKO VE ÇİNKO HOMEOSTAZİSİ	6
2.2. ZRT, IRT-BENZERİ PROTEİNLER (ZİP), ÇİNKO TAŞIYICI PROTEİNLER (ZNT) VE METALLOTİYONİN PROTEİNLERİ (MT)	7
2.2.1. METALLOTİYONİN PROTEİNLERİ (MT).....	8
2.2.2. ZRT, IRT-BENZERİ PROTEİNLER (ZİP).....	9
2.2.3. ÇİNKO TAŞIYICI PROTEİNLER (SLC30 AİLESİ, ZNT).....	11
2.3. METAL-YANITLAYICI TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ (MTF-1)	12
2.4. EPİGENETİK DÜZENLEMELER VE HİSTON DEASETİLAZLAR	13
<u>3. GEREKÇE VE AMAC</u>	<u>15</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM</u>	<u>16</u>
4.1. MATERYAL	16
4.2. YÖNTEM	16
4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	16

4.2.2. LX2 VE HEP40 HÜCRE HATLARINA TPEN, ZNPT VE ZNCL ₂ İÇİN MTT TESTİ 17	
4.2.3. TOTAL RNA İZOLASYONU.....	18
4.2.4. CDNA SENTEZİ.....	18
4.2.5. TERS TRANSKRİPTAZ-POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PZR).....	18
4.2.6. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ.....	19
4.2.7. KANTİTATİF EŞ ZAMANLI PZR.....	20
4.2.8. TOTAL PROTEİN İZOLASYONU	20
4.2.9. SDS-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ.....	21
4.2.10. PVDF MEMBRANA PROTEİN TRANSFERİ.....	21
4.2.11. PVDF MEMBRANA İMMOBİLİZE EDİLMİŞ PROTEİNLERİN İMMÜNOLOJİK SAPTAMASI	22
4.2.12. HÜCRE İÇİ BAZAL ÇİNKO SEVİYESİNİN ÖLÇÜLMESİ.....	22
4.2.13. HİSTON DEASETİLİZ (HDAC) AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ.....	23
4.2.14. KROMATİN İMMÜNOPRESİPİTASYON.....	23
4.2.15. İMMÜNOFLORESAN BOYAMASI.....	26
4.2.16. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	27
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	28
5.1. MTT CANLILIK TESTİ İLE TPEN, ZNPT VE ZNCL₂ KONSANTRASYONLARINA KARAR VERİLMESİ.....	28
5.2. HÜCRE İÇİ SERBEST ÇİNKO SEVİYESİ DEĞİŞİMLERİNİN SAPTANMASI	29
5.3. Zip7, zip8, zip14 VE ZNT7 KANAL PROTEİNLERİNİN İFADESİNİN TRANSKRİPT DÜZEYİNDE İNCELENMESİ.....	30
5.4. Zip7, zip8, zip14 VE ZNT7 KANAL PROTEİNLERİNİN İFADESİNİN PROTEİN DÜZEYİNDE İNCELENMESİ.....	33
5.4.1. WESTERN BLOT SONUÇLARI.....	34

5.4.2. İMMÜNOFLORESAN SONUÇLARI	36
5.5. TOTAL HDAC AKTİVİTESİ ÖLÇÜM SONUÇLARI.....	46
5.6. MMP2, MMP13, MT1 VE MT2 GENLERİNİN İFADESİNİN TRANSKRİPT DÜZEYİNDE İNCELENMESİ VE HDAC4'ÜN BAĞLANMA PROFİLİNİN KROMATİN İMMÜNOPRESİPİTASYON İLE İNCELENMESİ	47
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>54</u>
6.1. TARTIŞMA	54
6.2. SONUÇ.....	61
<u>EKLER</u>	<u>78</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>86</u>
<u>ÇIKAN YAYINLAR</u>	<u>88</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Karaciğer lobülü	3
Şekil 2.2 Karaciğer fibrozunun oluşumu	4
Şekil 2.3 Memeli hücresinde Zn^{2+} taşıyıcı kanal proteinlerinin ve metallothionein proteinlerinin yerlerinin gösterimi. Sitoplazmadaki Zn^{2+} 'u arttıran Zip proteinleri kahverengi, sitoplazmadaki Zn^{2+} 'u azaltan ZnT proteinleri yeşil renk ile gösterilmiştir.....	7
Şekil 4.1 HDAC aktivitesi ölçümünün moleküler mekanizması.....	23
Şekil 5.1 LX2 hücre hattı için yapılan canlılık testi % grafiği.	29
Şekil 5.2 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerinin hücre içi serbest Zn^{2+} değişimleri, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$	30
Şekil 5.3 LX2 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn^{2+} 'nun Zip ve ZnT çinko kanal proteinlerinin ile MTF-1'in mRNA seviyesi üzerindeki etkisinin qRT-PZR ile incelenmesi. Bağlı mRNA ifadesi her grubun kendi GAPDH ifadesine göre hesaplanmıştır. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma.	32
Şekil 5.4 Hep40 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn^{2+} 'nun Zip ve ZnT çinko kanal proteinlerinin ile MTF-1'in mRNA seviyesi üzerindeki etkisinin qRT-PZR ile incelenmesi. Bağlı mRNA ifadesi her grubun kendi GAPDH ifadesine göre hesaplanmıştır. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma	33
Şekil 5.5 LX2 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn^{2+} 'nun Zip ve ZnT çinko kanal proteinlerinin protein seviyesindeki etkisinin western blot ile incelenmesi. Normalizasyonlar için beta-aktin ve GAPDH referans gen olarak kullanılmıştır. Protein seviyesindeki değişiklikler kat değişimi şeklinde hesaplanmıştır. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$, Ortalama \pm Standart Sapma	34
Şekil 5.6 Hep40 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn^{2+} 'nun Zip (A, B, D) ve ZnT (C) çinko kanal proteinlerinin protein seviyesindeki etkisinin western blot ile incelenmesi. Normalizasyonlar için GAPDH referans gen olarak kullanılmıştır. Protein	

seviyesindeki değişiklikler kat değişimi şeklinde hesaplanmıştır. N=3, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$, Ortalama \pm Standart Sapma	35
Şekil 5.7 LX2 ve Hep40 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn^{2+} 'nın Zip7 kanalının aktif hali olan fosforile formunun protein seviyesindeki etkisinin western blot ile incelenmesi. Normalizasyonlar için GAPDH referans gen olarak kullanılmıştır. Protein seviyesindeki değişiklikler kat değişimi şeklinde hesaplanmıştır. N=3, $p<0,05^*$, Ortalama \pm Standart Sapma	36
Şekil 5.8 LX2 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn^{2+} 'nın Zip (A-B) ve ZnT (C) çinko kanal proteinlerinin protein seviyesindeki etkisinin immünofloresan tekniği ile incelenmesi. Zip7 n=12, Zip8 n=9, Zip14 n=8, Zn.t7 n=9, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$, Ortalama \pm Standart Sapma	37
Şekil 5.9 Hep40 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn^{2+} 'nın Zip (A-B) ve ZnT (C) çinko kanal proteinlerinin protein seviyesindeki etkisinin immünofloresan tekniği ile incelenmesi. Zip7 n=8, Zip8 n=7, Zip14 n=8, Zn.t7 n=7, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$, Ortalama \pm Standart Sapma	38
Şekil 5.10 LX2 hücrelerinde Zip7 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).....	39
Şekil 5.11 LX2 hücrelerinde Zip8 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).....	40
Şekil 5.12 LX2 hücrelerinde Zip14 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).....	41
Şekil 5.13 LX2 hücrelerinde ZnT7 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).....	42
Şekil 5.14 Hep40 hücrelerinde Zip7 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).....	43
Şekil 5.15 Hep40 hücrelerinde Zip8 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).....	44
Şekil 5.16 Hep40 hücrelerinde Zip14 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).	45
Şekil 5.17 Hep40 hücrelerinde ZnT7 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).	46
Şekil 5.18 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerindeki total HDAC aktivitesinin farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn^{2+} karşısındaki değişimi, $p<0,05^*$	47

Şekil 5.19 LX2 hücrelerinin MT1, MT2, MMP2 ve MMP13 gen ifadelerinin TPEN, ZnPT ve ZnCl ₂ uygulamalarından sonraki transkript seviyesindeki değişimlerinin qRT-PZR sonuçları. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma.....	48
Şekil 5.20 Hep40 hücrelerinin MT1, MT2, MMP2 ve MMP13 gen ifadelerinin TPEN, ZnPT ve ZnCl ₂ uygulamalarından sonraki transkript seviyesindeki değişimlerinin qRT-PZR sonuçları. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma.....	49
Şekil 5.21 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerinin kromatik kırma işlemi sonrasında validasyon jel görüntüleri, kırmızı kutucuk DNA cetvelinde 500 baz çifti hizasını göstermektedir	50
Şekil 5.22 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerinde HDAC4'ün MT1 genine bağlanma yüzdesinin kromatin immünopresipitasyonu ile incelenmesi. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma.....	50
Şekil 5.23 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerinde HDAC4'ün MT2 genine bağlanma yüzdesinin kromatin immünopresipitasyonu ile incelenmesi. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma.....	51
Şekil 5.24 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerinde HDAC4'ün MMP2 genine bağlanma yüzdesinin kromatin immünopresipitasyonu ile incelenmesi. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma.....	52
Şekil 5.25 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerinde HDAC4'ün MMP2 genine bağlanma yüzdesinin kromatin immünopresipitasyonu ile incelenmesi. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Zip ve ZnT proteinlerinin yerleşim bölgeleri	9
Çizelge 4.1 Hücre hatlarının idamesi için kullanılan besi yerleri.....	17
Çizelge 4.2 Kullanılan hücre hatları ve deney grupları	17
Çizelge 4.3 qRT-PZR'de kullanılan primer dizileri.....	19
Çizelge 4.4 RT-PZR koşulları	19
Çizelge 4.5 Primer amplifikasyon verimlilikleri	20
Çizelge 4.6 Kullanılan primerlerin PZR koşulları.....	21
Çizelge 5.1 Zip7, Zip8, Zip14 ve ZnT7 genlerinde bulunan MRE konsensüs sekansları ve bölgeleri.....	31
Çizelge 6.1 LX2 ve Hep40 hücrelerinin uygulama gruplarına göre hücre içi Zn ²⁺ yoğunlukları (nM)	57
Çizelge 6.2 Fibrotik fare karaciğer dokusu ve sağlık fare karaciğer dokusu ile yapılan mikrodizin sonuçları.....	61

SİMGELER DİZİNİ

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Baz çifti
BSA	Bovine serum albümin
cDNA	Komplementer DNA
ddH ₂ O	Çift distile su
Dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
ESM	Ekstrasellüler matriks
EtBr	Etidyum bromür
FBS	Fatal bovine serum
HCC	Hepatosellüler karsinoma
HSH	Hepatik stellat hücreler
kDa	Kilo dalton
KEH	Kolanjiyosit endotelyal hücreler
mL	Mililitre
MMP	Matriks metalloproteinaz
MT	Metallotiyonin

nM	Nanomolar
PBS	Fosfat salin tamponu
RPM	Dakika dönüş sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEH	Sinüsoidal endotelyal hücre
TAE	Tris asetat EDTA
TIMP	Metalloproteinaz doku inhibitörleri
ZnCl ₂	Çinko klorür



1. GİRİŞ

Karaciğerde meydana gelen hasarlanmalar karaciğer fibrozuna ve ilerleyen evrelerde siroz oluşumuna yol açabilmektedir. Sirozun ilerlemesinin ardından hepatoselüler karsinoma ve karaciğer yetmezliği gelişebilmektedir. Karaciğer fibrozisi başta fibriler kollajen olmak üzere, olağandışı miktarda ekstrasellüler matriks birikmesiyle sonuçlanan anormal bir yara iyileşmesi yanıtı olarak nitelendirilmektedir. Vitamin ve mineral takviyelerinin bileşeni olan çinkonun, cildin ve kasların erken yaşlanmasını önleyen anti-oksidan özellikler taşıdığı düşünülmektedir. Çinko vücuda dışarıdan alınması gereken bir element olup hücre içine transferi çinko taşıyıcı proteinler sayesinde olmaktadır. Karaciğer fibrozu ve devamında ortaya çıkabilen karaciğer kanserinde, hasta serumlarında çinko eksikliğinin olduğu bilinmektedir ve *in vivo* ve *in vitro* olarak yapılan çinko desteğinin, fibroz üzerindeki olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir. Fakat çinkonun anti-fibrotik mekanizması ile karaciğer kanseri üzerindeki etkisi tam olarak açıklanmamıştır. Bu çalışmanın amacı hücre içi çinkonun karaciğer fibrozisi gelişimindeki ve hepatoma hücreleri üzerindeki etki mekanizmasının çalışılmasıdır.

2. KURAMSAL TEMELLER

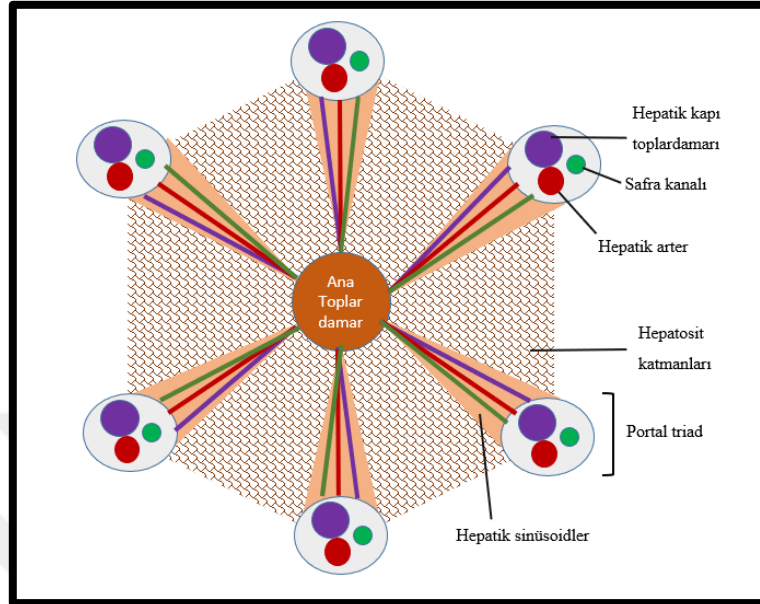
2.1. KARACİĞER

İnsan vücudundaki en büyük organ olan karaciğer, organizmanın devamlılığını sağlayan çok sayıda metabolik işleymden sorumludur. Metabolizmaya giren kimyasalların biyodönüşümünün gerçekleştirilmesi, eser elementlerin ve depolanabilir vitaminlerin depolanması, serum proteinleri ile pıhtılaşma faktörlerinin üretilmesi, kan glikoz seviyesinin ayarlanması ve ilaçların metabolize edilmesi karaciğerin anahtar rol oynadığı bazı metabolik faaliyetlerdir(1).

Karaciğeri oluşturan temel birimler lobüllerdir. Hekzagonal yapıdaki lobüller hepatosit tabakalarının arasında astar gibi dizilmiş sinüsoidal kapilerlerden oluşur (Şekil 2.1). Her lobülün ortasından geçen merkezi damarlar vardır ve sinüsoidal endotelial hücrelerden (SEH) oluşan kapiler yapı merkezi damardan dışarı doğru genişleyen bir yapıya sahiptir. Sinüsoidal endotelial hücreleri kan ve hepatositler arasındaki madde difüzyonu açısından önemli role sahiptirler. Hekzagonal lobüllerin her bir köşesinde üçlü damar kapısı bulunmaktadır: kapı toplardamarı, hepatik arter ve safra kanalı. Fonksiyon açısından loblar arasında fark yoktur bu açıdan homojen bir organdır. Karaciğerin yaklaşık %78'i hepatositlerden oluşur. %22'lik kısım ise Kuppfer hücreleri, doğal katil t hücreleri, kolanjiyosit endotelial hücreler (KEH), sinüsoidal endotelial hücreler ve hepatik stellat hücrelerden (HSH) oluşmaktadır(2,3).

HSH'ler sitoplazma içi yağ damlacıklarıyla karakterize olurlar ve A vitamini depolarlar. Sağlıklı karaciğerde sinüsoidal kontraktilitenin düzenlenmesi ve ESM organizasyonundan sorumludurlar. Fibrojeniz sürecinde etkin olan temel hücrelerdir. HSH'ler farklı sebeplerle hasar görmüş hepatositlerden ve olağan yapısı uyarılmış hepatik mikro çevreden yoğun şekilde uyarı alır. HSHlerin etkileşime geçerek fibrojenizin başlamasına neden olan hücre grupları hepatositler, hepatik makrofajlar, lenfositler ve endotelial hücrelerdir (4,5). Doğal katil t hücreleri ile HSHlerin etkileşime geçmesi ise HSHlerin öldürülmesi ve fibrojenik yanıtın son bulması ile sonuçlanır (6). Karaciğerde meydana gelen bir hasar-yaralanma sonrasında durgun HSH'ler miyofibroblast benzeri hücelere dönüşürler. Miyofibroblast benzeri hücelere dönüşümleri ile fibrotik yanıtın verilmesinde önemli rol oynarlar (7). Aktif hale geçmiş HSHlerin bu durumlarını korumaları doğal katil t hücreleri tarafından

öldürülememeleri için yine hepatik mikro çevreden uyarı sinyallerini alması gerekmektedir; bu sinyaller otokrin olarak HSH'lerden veya diğer inflamatuvar hücrelerden gelen sitokinler aracılığıyla HSH'lere iletilirler (5).



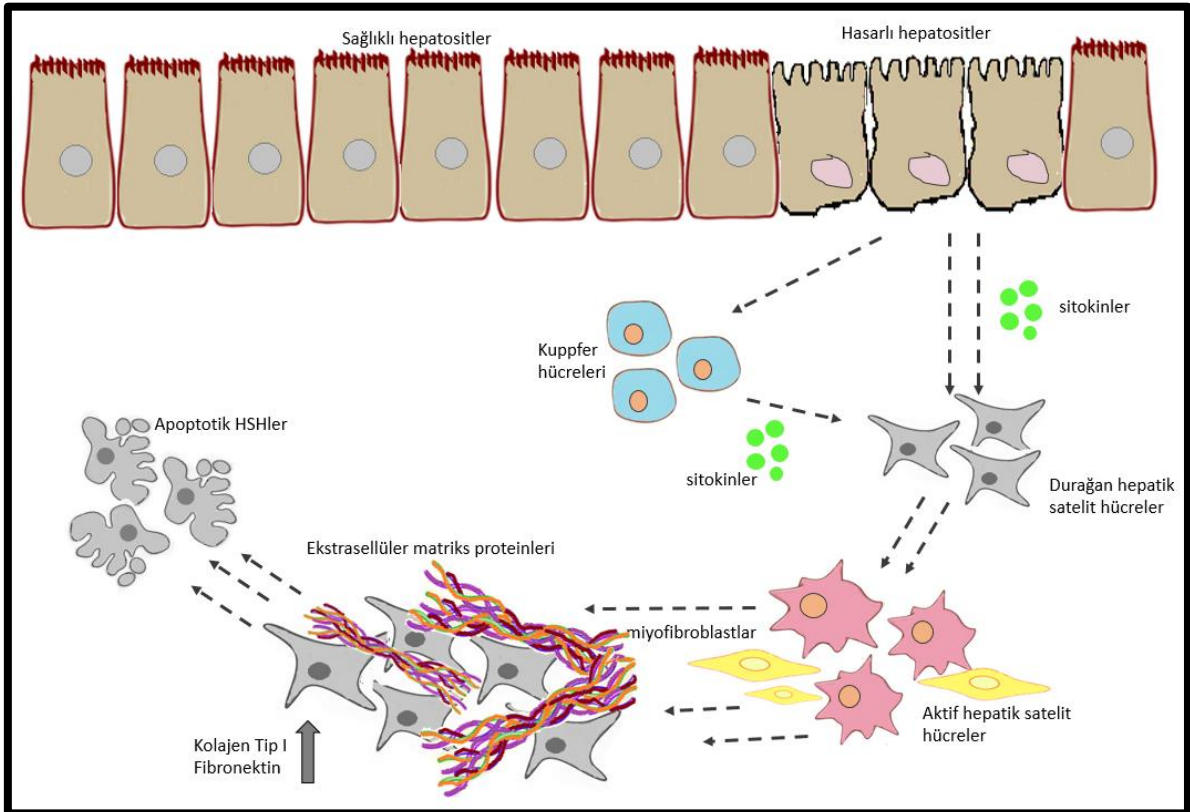
Şekil 2.1 Karaciğer lobülü

Kupffer hücreleri karaciğerde bulunan, endositoz ve fagositoz kapasiteleri yüksek yerleşik makrofajlardır. İnflamasyon yanıtı oluşumunda etken olan sitokinlerin salınmasından sorumludurlar. Akut karaciğer inflamasyonunu kontrol etmede ve doğal bağışıklık sisteminden gelecek yanıtın oluşmasında anahtar role sahiptirler. Bunun yanı sıra ESM oluşumundan sorumlu enzimlerin ve sitokinlerin salgılanmasından sorumludurlar (2).

2.1.1. KARACİĞER FİBROZU

Karaciğer fibrozu, karaciğerin hasar almasının ardından ESM proteinlerinin birikmesiyle organ dokusunun sağlıklı yapısının değişmesidir. Ekstrasellüler matriksin yeniden şekillendiği bu süreçte karaciğer rejenerasyonu ile fibrojeniz birlikte görülür ancak ESM proteinlerinin salınımı ve degradasyonu arasındaki denge oldukça önemlidir (8). Hepatik yaralanmanın ardından HSH'lerin miyofibroblast benzeri hücrelere dönüşümü gerçekleşir (Şekil 2.2) (9). HSH'lerin aktive edilmesi ile miyofibroblasta dönüşmesi birçok şekilde olabilmektedir: Viral hepatit, toksinler, otoimmün hastalıklar, alkolik ve alkolik olmayan hepatit başlıca nedenler olarak kabul edilmektedir (10). HSH aktivasyonu iki aşamada gerçekleşir, başlama ve pertürbasyon; hasar oluşumunun durgunlaşmasının ardından ise

rezolüsyon aşaması gelmektedir (11). Başlangıç aşaması hasar meydana geldikten hemen sonra başlar, gen ifadelerinde ve hücresel fenotipte değişiklik meydana gelir. Böylece HSH'ler sitokinlere ve diğer sinyallere yanıt oluşturabilecek uygun yapıya gelirler. Pertürbasyon aşaması HSH'lere gelen sinyallerin çıktısı olarak başlar ve hücreleri fibroza götürür. Profibrojenik, promitojenik ve proinflamatuvar faktörler salınır. Rezolüsyon aşamasında ise HSHlerin susması, olgunlaşması veya apoptoza gitmesi ile sonuçlanır (12,13).



Şekil 2.2 Karaciğer fibrozunun oluşumu

Miyofibroblastik fenotip kazanan HSH'ler yara iyileşmesi sürecinde rol alan ve bağışıklık yanıtını tetikleyen ESM proteinlerini salgırlar. Kollajen tip I, α SMA, fibronektin ve vimentin ifadeleri miyofibroblastları diğer hücrelerden ayıran belirteçlerdir (14). Aktive edilmiş HSH'ler kollajen I, III ve TIMP-I proteinlerinin karaciğer dokusundaki ana kaynaklardır (15). Ekstrasellüler matris yıkımından sorumlu olan katalitik protein grubu matris metalloproteinazlardır (MMP grubu); MMP'leri inhibe eden protein grubu ise metalloproteinazların doku inhibitörleridir (TIMP) (16). MMP-1 ve MMP-13 kollajen tip I'in, MMP-2 ve MMP-9 ise kollajen tip IV'ün birikimini engelleyen proteinazlardır (17). Karaciğer fibrozunun oluşum sürecinde, ESM proteinleri SEH'lerinin ve hepatositlerin

arasında birikir ve Kuppfer hücrelerinin aktif hale gelmesiyle inflamasyon yanıtının oluşur. Son olarak hepatositlerin apoptoza gitmesi ile SEH'lerindeki sağlıklı kan akışı engellenir (Şekil 1)(18). Bu şekilde ilerleyen yaygın karaciğer fibrozu durdurulmazsa siroza, ardından hepatosellüler karsinoma ve takiben organ iflasına kadar ilerleyebilir (10). Karaciğer fibrozu ve takip eden siroz oluşumunda hasta serumlarında çinko eksikliği olduğu bilinmektedir (17). Kronik karaciğer hastalıklarında serum ve hepatik çinko yoğunluğu düşmektedir (20,21). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla çinko takviyesinin karaciğer fibrozu üzerinde iyileştirici etkisinin bulunduğu gösterilmiştir (18).

Siroz, sağlıklı karaciğer lobüllerinin yerini fibrotik doku ile ayrılmış anormal yumrucukların alması şeklinde tanımlanmaktadır. Siroz tanısı karaciğer fibrozunun son evresinde konulabilmektedir (23). Düşük hepatosit sayısı ve karaciğer fibrozunda olduğunda çok daha yoğun ESM birikimi sirotik karaciğerin karakteristik özellikleridir. Siroz tedavisinde en sık kullanılan yöntem karaciğer naklidir ancak ameliyatın zor olması ve uygun doku bulunmasının zorluğu yeni terapötik tedavilerin hücresel boyutta geliştirilmesi için yapılan çalışmaların yoğunlaşmasına sebep olmuştur. Hücresel boyutta tedavilerin odak noktası hepatosit sayısını arttırmaya ve ESM miktarını dengelemeye yöneliktir (24).

İleri seviyede siroz, kronik hepatit B ve C enfeksiyonu, aflatoksin B1 maruziyeti ve yoğun alkol tüketimi hepatosellüler karsinoma (HCC) gelişimini etkileyen temel faktörlerdir. Her bir faktörün farklı hepatosellüler karsinogenez yolağı vardır. Karaciğer kanserinin karakteristik özellikleri hücre yaşam döngüsünün düzenleyen p53, p16, siklin D1 veya retinoblastoma gibi kilit genlerde mutasyon veya genetik değişiklik meydana gelmesi, vasküler endotelial büyüme faktörünün ifadesinin artmasına bağlı olarak anjiyojenezin yoğunlaşması, antiapoptotik sinyallerin artması şeklinde sıralanabilir (25). Kanser kök hücreleri ve epigenetik yeniden programlanmanın da HCC karsinogenezinde etkin olduğu bilinmektedir (26). Karaciğer kanser kök hücrelerinin tanımlanması için bazı belirteçlerin pozitiflikleri değerlendirilebilir: CD133 pozitifliği, hepatik progenitör belirteci OV6 pozitifliği, EpCAM ve alfafetaproteininin çift pozitifliği, CD90 ve CD45 çift pozitifliği (27–29).

HCC ve çinkonun ilişkisi üzerinde yapılmış farklı popülasyonlardaki çalışmalarda HCC dokusundaki çinko miktarının sağlıklı karaciğer dokusuna kıyasla yaklaşık %55-75 oranında

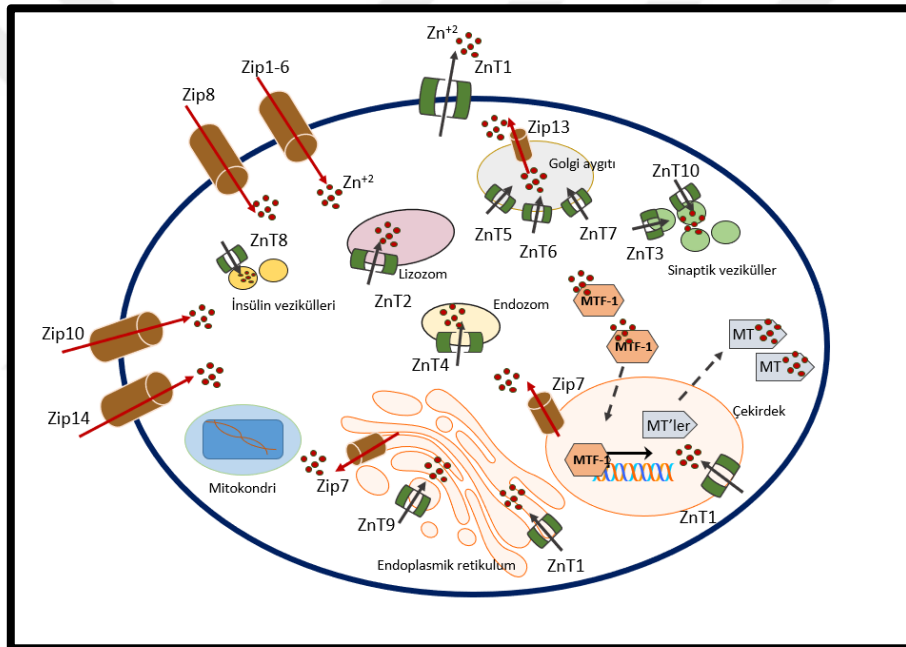
az olduğu gösterilmiştir (30–33). HCC dokusundaki çinko düşüklüğünü beraberinde Zip14 çinko kanal proteininin de ifadesinde düşüş olduğu gösterilmiştir, hatta bu durumun HCC dokusunun moleküler belirteci olarak değerlendirilebileceği öne sürülmüştür (34). Fizyolojik koşullarda çinko hücreler için sitotoksik özellikte değildir ancak çinkonun olağan hücrenel dağılımı, artışı veya azalışı, değişirse sitotoksik ve patofizyolojik sonuçlar doğurabilir. Bu durum malin hücreler için de geçerlidir fakat sağlıklı bir hücrenin işleyişi ile malin bir hücrenin işleyişi aynı olmadığı gibi yaşamsal fonksiyonları için gerekli olan çinko miktarı da aynı değildir (35,36). Hücre içi fizyolojik yoğunlukta bulunan çinko kanser hücrelerinde bölünmenin durmasına ve hücrenin apoptoza gitmesine sebep olduğu gösterilmiştir. Malin karakter kazandıran invazyon ve migrasyon yetilerini de ortadan kaldıran çinko malin kanser hücrelerin de kanser baskılayıcı olarak değerlendirilebilir (37,38). Çinkonun kanser baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmaya yönelik evrimleşen malin kanser hücreleri, hücre içi çinko konsantrasyonu fizyolojik seviyenin altına indirmeyi sağlayan mekanizmalarla çinkoyu kendisi için sitotoksik olmayan seviyelerde tutmaktadır. Bu durumda bizim açımızdan değerlendirildiğinde HCC hücrelerinde çinko eksikliği olduğu yönündedir. Çinko kanal proteinlerinin ifade seviyelerinin düzenlenmesi ile hücre içi çinko birikimi HCC hücrelerinde azalmaktadır ve bu düzenleme kanserin ilk evrelerinden itibaren gerçekleşmektedir (39).

2.1.2. ÇİNKO ve ÇİNKO HOMEOSTAZİSİ

İnsan vücudunda demirden sonra en çok bulunan ikinci eser element çinkodur ve erişkin bir insanın vücudunda yaklaşık 2 gr, plazmasında 12-16 $\mu\text{M Zn}^{+2}$ bulunmaktadır. Çinkonun en yoğun bulunduğu doku, %60'lık oranla iskelet kas dokusudur, %30'la kemikler ve %5 ile karaciğer takip eder (40). Hücre içi temel fonksiyonlarda ve hücreden hücreye değişiklik gösteren bazı tepkimelerde kofaktör olarak kullanıldığı bilinmektedir, transkripsiyon faktörleri ve enzimler çinkonun bağlanmasıyla aktif hale gelen protein gruplarındandır. Çinko içeren 300'den fazla enzim tespit edilmiştir ve çinko eksikliği birçok temel biyolojik reaksiyonu sekteye uğratmaktadır. Bağışıklık, tat alma, kemik gelişimi ve büyümesi, protein sentezi ve gen ekspresyonu sekteye uğrayan reaksiyonlardan bazılarıdır (41,42). Hücre bölünmesi, büyümesi ve farklılaşması gibi çok temel olayda yapısal ve katalizör olarak rol alan çinko, enzimler, taşıyıcı kanal proteinleri, transkripsiyon faktörleri ve reseptörlere bağlanarak işlevsellik kazanır (43,44). Gıdalarla alınan çinko bağırsaktaki epitel hücreler

tarafından emilir. Emilen çinko çoğunlukla albümine ve makro globuline bağlı şekilde kanda taşınır böylece vücudun tüm dokularına ulaştırılır (45).

Hücre içerisine alınan çinkonun dağılımı yarısı sitoplazmada kalacak şekilde %40'lık oranın çekirdeğe alınması ve %10'un hücre zarına bağlanması şeklinde gerçekleşir (46). Yapılan biyoinformatik araştırmalar çinkonun hücre içerisindeki proteinleri %15'ine bağlı bulunduğu gösterilmiştir (14). Hücre içerisinde çinko homeostazisini sağlanması hücre zarı üzerinde ve organeller üzerinde bulunan çinko taşıyıcı kanallar aracılığıyla sağlanmaktadır. Bunun yanı sıra çinko, çinko parmak motifi bulunduran proteinlere karşı yüksek bağlanma afinitesine sahiptir; bu durum da hücre serbest çinko seviyesinin dengelenmesinde rolü büyüktür (15).



Şekil 2.3 Memeli hücresinde Zn^{2+} taşıyıcı kanal proteinlerinin ve metallothiyonin proteinlerinin yerlerinin gösterimi. Sitoplazmadaki Zn^{2+} 'u arttıran Zip proteinleri kahverengi, sitoplazmadaki Zn^{2+} 'u azaltan ZnT proteinleri yeşil renk ile gösterilmiştir

2.2. ZRT, IRT-BENZERİ PROTEİNLER (ZIP), ÇİNKO TAŞIYICI PROTEİNLER (ZNT) VE METALLOTİYONİN PROTEİNLERİ (MT)

Hüresel çinko homeostazisinin sağlanmasında ana rol oynayan proteinler Zn^{2+} taşıyıcı kanal proteinleri ve Zn^{2+} bağlayıcı metallothiyonin (MT) proteinleridir. Çinko taşıyıcı proteinlerin tamamının transmembran yani hücre veya organel zarı üzerine yerleşmesini

sağlayan bölgeleri bulunmaktadır. İki farklı çözünen madde taşıyıcı gen ailesi tarafından kodlanan protein aileleri şu şekildedir: Zrt, Irt-benzeri (Zip, çözünen madde taşıyıcı aile 39A) ve çinko taşıyıcı proteinler (ZnT, SLC30A). İnsanlarda sitoplazmadaki çinko miktarını arttıran 14 Zip proteini, azaltan 10 adet ZnT taşıyıcı proteini tanımlanmıştır (44,49). Zip proteinleri sitoplazmadaki çinko yoğunluğunu ya hücre zarı üzerindeki Zip6, Zip8, Zip10 ve Zip14 ile hücre dışından hücre içine alarak ya da hücre içi kompartımanların üzerinde bulunan Zip13 ve Zip7 ile organellerde depolanan çinkoyu sitoplazmaya taşıyarak arttırmaları. ZnT proteinleri ise hücre zarında bulunan ZnT1 ile sitoplazmadaki çinkoyu dışarı çıkartarak ve organellerin üzerinde bulunan ZnT1, ZnT2, ZnT3, ZnT4, ZnT5, ZnT6, ZnT7 ve ZnT8 ile sitoplazmadaki çinkoyu hücre içi kompartımanlara depolayarak hücre içi çinko homeostazisini sağlamada rol alırlar (Şekil 3.3) (49,50).

2.2.1. METALLOTİYONİN PROTEİNLERİ (MT)

MT proteinleri ilk karakterize edildiklerinde metal iyonu içeren proteinler olarak tanımlanmışlardır. Esas görevleri hücre içinde bulunan Zn^{2+} gibi metal iyonlarını bağlayarak hücre içi metal iyonu yoğunluğunu belirli bir seviyede tutmaktır. Mitokondri ve endoplazmik retikulumun çinko depoladığı bilinse de MT proteinleri Zn^{2+} iyonlarını bağlayarak hücre içerisindeki en büyük çinko deposu görevini yaparlar. Hücre içi Zn^{2+} yoğunluğu olması gerekenden düşükse MT proteinleri proteolize uğrarlar. Proteolize olan MT'lerde depolanan Zn^{2+} iyonları serbest hale gelir böylece hücre içi Zn^{2+} seviyesi istenen seviyeye gelmiş olur (51). Stres ortamında bulunmayan hücrelerde bazal seviyede MT proteinleri bulunur ve çinko yüklü durumdadırlar (52). Depolara alınan çinkonun yeniden serbest hale gelmesi oksidatif stres ve Ca^{+} gibi başka iyonların yoğunluk değişimi gibi sebeplerden dolayı gerekmektedir (53–55). İnsanlarda MT proteinleri 4 ana gruba ayrılırlar ve toplam 11 işlevsel izoform olarak bulunurlar. Sekiz adet MT-1 geni (MT1-A,B,E,F,G,H,M,X), tek kopya olarak da MT-2 (MT-2A), MT-3 ve MT-4 genleri vardır (51). MT-3 yoğunlukla beyin dokusunda sentezlenirken MT-4 bazı epitel dokularda yoğunluk göstermektedir (56). MT-1 ve MT-2 proteinleri ise genellikle çinko metabolizması üzerine yapılan çalışmalarda incelenmektedir (57).

MT proteinleri depo görevlerinin yanı sıra, Zn^{2+} 'ya düşük afinite ile bağlandıklarından dolayı çinko tamponu olarak da işlev göstermektedir. Zn^{2+} yoğunluğunun gerektiğinden

düşük olduğu ortamlarda çinko bağlayıcı diğer enzim ve proteinlere Zn^{2+} sağlarlar (58). Koenzimleri bağlanmadan aktif hale gelemeyen apoenzimler buna ilişkiye verilen en spesifik protein grubudur. Bir adet MT proteini 7 adet Zn^{2+} (Zn_7 -MT) bağlayarak satüre hale gelir. Yapılan bir çalışmada Zn_7 -MT ve Zn_6 -MT proteinleri hücre içi primer Zn^{2+} donörleri olarak görev almaktadırlar (59). Bunun tersi de geçerlidir, apoenzimlere Zn^{2+} vermiş MT proteinlerinin çinko parmak motifli transkripsiyon faktörü Sp1 ve transkripsiyon faktör III'ten Zn^{2+} iyonlarını kendi üzerine alarak iki proteinin de DNA'ya bağlanmalarını engellediği 1991 yılında yapılan iki çalışmada gösterilmiştir (60,61). Yani MT proteinleri çinko bağlayan proteinlerin şaperonu olarak da işlev görmektedir. MT-1 ve MT-2 proteinleri çinko metabolizması çalışılırken çoğunlukla birlikte değerlendirilen iki protein olmalarına rağmen kendilerine özgü spesifik fonksiyonlarının olduğu yapılan son çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Örneğin satüre durumdayken MT-2 daha kararlı yapıdadır, MT-1 aynı durumda daha çabuk yıkıma uğramaktadır (62).

Çizelge 2.1 Zip ve ZnT proteinlerinin yerleşim bölgeleri

Lokasyon	Taşıyıcı Protein
Hücre Zarı	ZiP1,2,3,4,5 6,8,10,14 ve ZnT1
İnsülin granülleri	ZnT5 ve ZnT8
Golgi cisimciği zarı	ZiP13, ZnT5, 6 ve7
Endozom	ZnT4
Lizozom	ZnT2
Sinaptik vezikül	ZnT3
Endoplazmik retikulum	Zip7 ve ZnT1

2.2.2. ZRT, IRT-BENZERİ PROTEİNLER (ZIP)

SLC39 taşıyıcı proteinleri, metal iyon taşıyıcı protein ailesinin (ZIP gen ailesi) üyeleridir (63,64). Bu gen ailesine üye, farklı filogenetik seviyelerde, bilenen en az 86 gen vardır (65). İki alt aileden oluşmaktadır: ilki çoğunlukla bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır, ikincisi ise memelilerde ve böceklerde bulunan genlerden oluşmaktadır (63). Zip

proteinlerinin çoğunda ekstrasellüler veya intraveziküler amino ucu ve karboksi ucu bulunan sekiz adet transmembran bölgesi bulunduğu düşünülmektedir (66).

Zip1 (SLC39A1), Zip2 (SLC39A2) ve Zip3 (SLC39A3) hücre zarı üzerinde lokalize olan Zip proteinlerindedirler. Hücre içine ekstrasellüler ortamdan Zn^{2+} alırlar. Yapılan hayvan deneylerinde Zip1 geni düşürülmüş farelerde herhangi bir fenotip değişikliği olmamasına rağmen hamile farelere çinkosu eksik diyet uygulandığında embriyoların yaşam oranları etkilenmiştir (67). Bu durum hücre zarında bulunan diğer Zip proteinlerinin işlevselliğinin Zip1 olmasa da devam ettiğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada Zn^{2+} şelatörü TPEN ile muamele gören mononükleer periferik kan hücreleri ve THP-1 monositik hücrelerde Zip2 mRNA ifadesinin arttığı gösterilmiştir; bahsi geçen Zip proteinlerinin ifade seviyesinin düzenlenmesi hücre dışı/içi çinko seviyesinden etkilenmektedir (68). Zip4 (SLC39A4) de hücre zarı üzerinde lokalize olmuştur ve vücutta Zn^{2+} emiliminin olduğu ince bağırsak, mide ve kolon gibi dokularda ifade seviyesi oldukça yüksektir (69). Zip5 (SLC39A5) homolojisi açısından Zip4'e oldukça benzerdir. İfadesinin yüksek olduğu dokular Zip4 ile aynıdır ondan farklı olarak karaciğer ve böbrekte de ifade edilmektedir. Ancak Zip5, Zip4'ün aksine Zn^{2+} yoğunluğu fazla olduğu ortamlarda aynı hücre tiplerinin basolateral bölgesinde lokalize durumdadır (70). Zip6 (SLC39A6), Zip protein ailesinin alt ailesi olan LIV-1 gen ailesinin bir üyesidir, hücre zarı üzerinde bulunmaktadır. İfadesinin östrojen uygulamasının ardından MCF-7 ve ZR-75 meme kanseri hatlarında arttığı gösterilmiştir (71). Steroid hormonlara duyarlı olan dokularda, plasenta, meme bezi ve prostat gibi, ifade seviyesi fazladır. Meme kanserinin yanı sıra yapılan çalışmalarda HeLa hücre hattında ve akciğer kanseri hücre hatlarında da ifadesinin fazla olduğu gösterilmiştir (66). Zip7 (SLC39A7), hem golgi aygıtının hem de çekirdek zarının üzerinde bulunan bir çinko kanal proteindir. Zip8 (SLC39A8), hücre zarı üzerinde bulunan çinko kanal proteinlerindedir. Böbrek, akciğer, karaciğer, ince bağırsak, beyin ve kırmızı kan hücrelerinin zarlarında bulunduğu gösterilmiştir (49). Zip14 (SLC39A14), aminoasit dizilimi açısından Zip8'e benzer motifler içermektedir ve hücre zarı üzerinde bulunmaktadır. Zip14'ün diğer çinko taşıyıcı kanal proteinlerden en temel farkı inflamasyona cevap olarak ifadesinin düzenlenmesidir. Hipoferremi ve hipozinkemi inflamasyonun akut evresinde görülen sonuçlardır (72). Farelerle yapılan bir çalışmada hepatositlerin hücre zarında bulunan Zip14'ün fonksiyonel olarak proinflamatuvar sitokin IL-6'e bağlı olduğu gösterilmiştir (73).

2.2.3. ÇİNKO TAŞIYICI PROTEİNLER (SLC30 AİLESİ, ZNT)

SLC30 gen ailesinin, tüm filogenetik seviyelerde, 100'ü aşkın üyesi vardır, kendi içinde üç alt aileye ayrılır: alt aile I çoğunlukla prokaryotik canlılarda ifade edilirlerken, alt aile II ve III ökaryotik ve prokaryotik canlılarda aynı oranda ifade edilirler (74).

ZnT1 (Slc30a1) ilk karakterize edilen çinko taşıyıcı proteindir (75). ZnT1 transkript ifadesi çinko alımının, dönüşümünün ve geçişinin yoğun olduğu villus hücrelerinde, plasentada ve renal tübüler epitel hücrelerde daha fazladır (76). ZnT1'in hücredeki lokalizasyonu hücre membranı üzerindedir. Znt1'in dokular arasında değişen ifade farklılığından kaynaklı olarak çinko takviyesine veya çinko eksikliğine verdiği yanıt netleştirilmemiştir. İnsan hepatoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada Znt1'in mRNA seviyesinin arttığı gösterilmiştir (77). Hücre zarından geçebilen çinko şelatörü TPEN uygulandığı zamansa, hücre içi serbest çinko yoğunluğunun azalmasına bağlı olarak Znt1 mRNA ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (74). Znt2 (Slc30A2) geç gebelik döneminde ve erken süt salgılanması döneminde maternal ve fetal dokularda ifadesi yüksektir (76). Znt2'nin çinko homeostazisindeki rolü tamamen aydınlatılamamışsa da meme bezinde ifadesinin fazla olması anne sütündeki çinko miktarının ayarlanmasında etkin olduğunun düşünülmesine sebep olmaktadır (49). Znt3 (Slc30A3)'un toplam 6 tane zar üzerinde bulunan bölgesi ve Znt2 ile %52'lik bir amino asit dizisi benzerliği vardır. Znt3 mRNA'sının farelerde en yoğun olarak hipokampus ve beyin korteksinde bulunduğu gösterilmiştir. Memeli beyinde bulunan çinkonun %5-15'i sinaptik veziküllerde yoğunlaşmıştır. Znt3 sinaptik veziküllere çinko alimini sağlamaktadır ve sinaptik veziküllerin membranlarında yoğunlukla bulunduğu gösterilmiştir (78,79). Znt4 (Slc30A4) de Znt2 gibi meme bezlerinde yoğun bulunmaktadır. Farelerde yapılan bir çalışmada Slc30A4 kodlayan gende meydana gelen mutasyonun çinko içeriği eksik süt üretimine sebep olduğu gösterilmiştir. Ancak anne sütünün çinko yoğunluğunun sağlanmasında tek sorumlu taşıyıcı kanal Znt4 olmadığı için postnatal çinko eksikliği Znt4 mutasyonu ile açıklanamamaktadır (80). Znt4 meme bezinin yani sıra fare beyinde ve sindirim sistemi epitellerinde de yoğun olarak ifade edilmektedir (74). Hücre içinde ise golgi zarının üzerinde bulunmaktadır (81).

Znt5 (Slc30A5)'in tüm insan dokularında ifadesi bulunmaktadır ancak en çok, insan vücudunda en yoğun çinko bulduran hücreler olan, insülin içeren beta hücrelerinde ifade

edilmektedir (82). Znt6 (Slc30A6) mRNA'sı karaciğer, beyin ve böbreklerde saptanmışsa da protein düzeyinde yalnızca beyin ve akciğerde saptanabilmiştir (83). Znt7 (Slc30A7) fare dokularından karaciğer ve sindirim epitellerinde daha yoğun olmak üzere, beyin, akciğer, böbrek, kalp, dalakta ifade edilmektedir. Znt7 hücre içerisinde golgi aygıtı üzerinde ve sitozolik veziküller üzerinde lokalize olmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki Znt7 kanal proteini sitoplazmadaki serbest çinkonun golgi aygıtına depolanmasında rol almaktadır (84). Znt8 (Slc30A8) pankreasta bulunan Langerhans adacıklarına özel çinko taşıyıcı kanal olarak 2004'te tanımlanmıştır (85). İnsülin üreten beta hücrelerinin Langerhans adacıklarında bulunmaktadır. Üretilen insülinin hücre dışına salgılanması sırasında salgı veziküllerinde bir insülin heksamerine bağlı iki Zn⁺² iyonu şeklinde depolanmaktadır. 2007 yılında tip II diyabet ile Znt8 ilişkilendirilmiştir; Slc30A8 geninde meydana gelen nokta mutasyonunun insülin salgısını azalttığı gösterilmiştir (86). Znt9 (Slc30A9) kanal proteini ilk olarak insan embriyonik akciğer hücrelerinden izole edilmiştir (87). Serebellum, timüs, böbrek ve iskelet kaslarında ifadesi yüksekti. Proteinin altı adet transmembran bölgesi olduğu tahmin edilse de hücreSEL herhangi bir zar ile ilişkilendirilememiştir. Sitoplazmada bulunmaktadır ve yapılan çalışmalarda endoplazmik retikulum(ER) ile ilişkilendirilebileceğini göstermiştir ancak golgi aygıtı veya endozomal yapılarla herhangi bir kolokalizasyon gösterilmemiştir (88). Znt10 (Slc30A10) ilk karakterize edildiğinde yalnızca fetal beyin ve fetal karaciğer dokularında ifade edildiği gösterilmiştir. Bu sebeple fetal gelişimde çinko homeostazisinin sağlanmasında kilit rolde olduğu düşünülmekteydi (89). Ancak yakın zamanda yapılan çalışmalar göstermiştir ki Znt10 ifadesi yalnızca fetal dokularla sınırlı değildir; aynı zamanda ince bağırsak, karaciğer ve beyinde ifadesi bulunmaktadır. İfadesinin en yüksek olduğu doku beyin dokusudur. Nörodejeneratif hastalıkların gelişmesindeki çinko eksikliğinin rolü düşünüldüğünde Znt10 taşıyıcı proteinin bu tip hastalıklar ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir (90).

2.3. METAL-YANITLAYICI TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ (MTF-1)

Metal-yanıtlayıcı transkripsiyon faktörü veya metal-düzenleyici transkripsiyon faktörü-1 hücrenin farklı stres koşullarına adaptasyonunu düzenleyen transkripsiyonel düzenleyici bir proteindir. Hücrelerin ağır metale maruz kalması, hipoksi ve oksidatif stres MTF-1'in fonksiyon gösterdiği stres koşullarıdır, esas fonksiyonu MT genlerinin aktif hale getirilmesidir (şekil 2.3) (91). MTF-1'in fonksiyon gösterebilmesi için ilgili genin

promotorunda bulunan metal-yanıt dizisine (MRE dizisi) bağlanması gerekmektedir. Çoğu MT geninin promotor ve güçlendirici bölgesinde metal-yanıt dizisi (MRE dizisi) yer almaktadır (91). MRE dizisi TGCRCNC (r= herhangi bir pürin bazı, n= herhangi bir pürin ya da primidin bazı) şeklindedir ve böceklerden memelilere oldukça korunmuş bir uzlaşma dizisidir (93). Fizyolojik koşullarda MTF-1 geni sitoplazmada durgun olarak bulunmaktadır, fakat hücrenin ağır metale maruz kalması veya oksidatif stres oluşumu gibi stres faktörlerinin varlığında aktif hale geçerek hücre çekirdeğine geçiş yapar. Çekirdeğe geçiş yapan MTF-1 transkripsiyon faktörü stres durumunda ifadesinin düzenlenmesi gereken genlerin promotorlarında bulunan MRE dizisine bağlanarak işlev gösterir (93,94). MTF-1'in aktif duruma geçmesi için hücre içi ağır metal yoğunluğunun belirli bir seviyeye ulaşması yeterlidir ancak MTF-1'in gerekli afinitede DNA'ya bağlanabilmesi için hücre içerisindeki çinko iyon yoğunluğunun belirli bir seviyenin üzerine çıkması gerekmektedir (95,96). Çinko MTF-1'in transkripsiyon faktörü olarak işlevsellik kazanması açısından önemlidir çünkü MTF-1 başka ağır metaller aracılığıyla aktive olsa bile yeterli zn^{2+} olmadığı sürece MRE dizisine bağlanamaz.

2.4. EPİGENETİK DÜZENLEMELER VE HİSTON DEASETİLAZLAR

Conrad Waddington 1942 yılında DNA dizisi üzerinde meydana gelen, fenotipi etkilerken genotipte değişikliğe sebep olmayan modifikasyonlar için "epigenetik" terimini kullanmıştır. Daha geniş açıklamasıyla epigenetik, mitoz/mayoz bölünme yoluyla kalıtılabilen ancak DNA dizisini değiştirmeden yalnızca gen fonksiyonunu etkileyen değişiklikler olarak tanımlanabilir. Hücresel DNA çekirdek içerisinde histon proteinleri etrafına sarılı biçimde paketlenmiş durumdadır. DNA ve sarılı olduğu histon proteinlerinden oluşan yapıya kromatin adı verilmektedir. Epigenetik değişikliklerde genetik bilginin fizyolojik formu olarak nitelendirilen kromatin yapısı değişmektedir ve kromatin yapısında meydana gelen bu değişiklikler aracılığıyla genlerin ifadesi kontrol edilmektedir. (92). Kromatin yapısının DNA üzerinde yoğunlaştığı bölgelerde bulunan genlerin ifadesi azalmakta ya da kaybedilmekteyken, seyrekleştiği bölgelerde tam tersi bir durum gözlemlenmektedir. Kromatin yapısının bölgesel olarak yoğunlaşması ve/veya seyrekleşmesi epigenetik modifikasyonlar ile sağlanmaktadır. Histonlar moleküler ağırlıkları küçük proteinlerdir ve içerdikleri arginin ile lizine göre isimlendirilmişlerdir. Ana histon proteinleri H2A, H2B, H3 ve H4; ara/bağlayıcı histon proteinleri ise H1-H5 histonlarıdır. Ana histon proteinleri

üzerinde meydana gelen metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi amino asitler üzerinde meydana gelen değişiklikler ile kromatin yapısı değişmektedir (93,94). Histonların hangi amino asiti üzerinde ne tip bir değişiklik meydana geldiyse histon modifikasyonu ona göre isimlendirilir. Örneğin, H4K12Ac modifikasyonu, dördüncü histon proteininin on ikinci lizininin asetillendiğini göstermektedir. Histonlar üzerinde meydana gelen bu değişikliklerden sorumlu enzimler karakterize edilmiştir. Bahsi geçen modifikasyonlar geri dönüşümlü oldukları için hücresel gen ifadeleri farklılık gösterebilmektedir, böylelikle farklı hücre tipleri oluşabilmektedir. Ancak bu enzimlerin aktivitelerini etkileyen başka düzenleyici proteinlerin olduğu tahmin edilse de bir kısmı hala açıklığa kavuşmamıştır (95,96). Histon asetil transferazlar (HAT) histonlara asetil grupları eklerken, histon deasetilazlar (HDAC) asetil gruplarını çıkartmaktadır. Histonların asetilasyonu gen ifadelerinin kontrol edilmesinde önemli rol oynayan, geri döndürülebilir bir epigenetik modifikasyondur. Histon asetilasyonunun kontrolü HAT ve HDAC proteinlerinin tersinir çalışmalarıyla sağlanır. HAT proteinleri histonlara asetil grupları ekleyerek kromatin yapısını gevşetip transkripsiyona açık hale getirirken HDAC proteinleri asetil gruplarını kaldırarak kromatin yapısını kapatmaktadır. HAT ve HDAC proteinlerinin spesifik DNA dizilerine bağlanabilen proteinlere birlikte çalışması, bu proteinlerin spesifik genleri açıp kapatmasını sağlamaktadır. HDAC4, HDAC3 N-CoR baskılayıcı protein kompleksini oluşturduktan sonra deasetilaz özelliği aktif hale gelmektedir (97). HDAC4'ün HDAC3 ile fonksiyonel bir baskılayıcı kompleks oluşturabilmesi için çinko bağlayıcı bölgesinin translasyon sonrası düzgün katlanmış olması gerekmektedir, yani çinko bağlayıcı bölgesi baskılayıcı aktivitesi için son derece önemlidir (98). HDAC4 de bir protein olduğu için post translasyonel modifikasyonlara uğramaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki HDAC4'ün fosforile olmasının ardından çekirdekte sitoplazmaya geçişi gerçekleşmektedir (99). Defosforilasyonu ise çekirdeğe dönmesini sağlamaktadır. Protein fosfat 2A (PPP2A)'nın HDAC4'ü defosforile ettiği ve çekirdekte birikimine sebep olduğu bilinmektedir (100).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Bu tez çalışmasının amacı hücre içi eser element olan çinkonun ve çinko kanallarının karaciğer fibrozu gelişiminde etki mekanizmasının araştırılmasıdır. Yapılan çalışmalar ile fibroz oluşumunda önemli rol oynayan HSC hücrelerinde meydana gelen genetik ve epigenetik değişikliklerin çinko ile ilişkisi ve bunun mekanizması araştırılmıştır. Bu doğrultuda, çinkonun fibroz oluşumunda etki mekanizmasının anlaşılması ile halk sağlığında yaygın görülen, fibroz ile başlayıp karaciğer yetmezliği ile sonuçlanan karaciğer hastalıklarının tedavisinde etkili olabilecek önemli bulgular elde edilebilmesi hedeflenmiştir.



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Kullanılan başlıca kimyasallardan başlıcaları; Tris-Base tampon maddesi ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, moleküler ağırlık 121.14) Tris-HCl (10 mM) tampon maddesi, kloroform (CHCl_3 , Molekül ağırlığı 119.38), metanol (Invitrogen LifeTechnologies, CH_4O), etanol (Invitrogen LifeTechnologies, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), Etidyum bromür solüsyonu (EtBr, 10 ml -10 mg/ml-, Invitrogen, Cat. No. 15585, Lot. No. 0912M05351)

Kitler Promega (ABD), New England Biolabs (ABD), Cell Signaling Technology (ABD), Thermo Fischer (ABD), Invitrogen (ABD)'den temin edilmiştir. Genel laboratuvar kimyasalları, Sigma Chemical Co. (St. Louis, ABD), Merck (Darmstadt, Almanya) ve AppliChem (Darmstadt, Almanya) ürünleri kullanılmıştır.

Kullanılan standart solüsyonların tarifleri Ek-1'de listelenmiştir.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada kullanılan hücre hatları: insan HCC hücre hattı HEP40 ve insan karaciğer stellat hücre hattı LX2. HEP40 hücre hattı %10 FBS ve %1 penisilin/streptavidin ile tamamlanan DMEM düşük glikozlu besi yerinde kültür edilmişlerdir. LX2 hücre hattı ise DMEM yüksek glikozlu besi yerinin (Gibco, 11965092) %10 FBS ve %1 penisilin/streptavidin ile tamamlanmasıyla hazırlanan besi yerinde kültür edilmiştir (Çizelge 4.1). Hücreler 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2 bulunan ortamda inkübe edilmişlerdir. Besi yeri her üç günde bir değiştirilmiştir. Hücrelerin dondurularak saklanması 1200 RPM'de 5 dk santrifüjün ardından 1mL kendi besi yerlerine eklenen %1 DMSO ile çözdürüldükten sonra krayo tüplerde bir gece -80°C 'de bekletildikten sonra sıvı nitrojene alınarak yapılmıştır.

Çizelge 4.1 Hücre hatlarının idamesi için kullanılan besi yerleri

Hücre hattı	Hücre adı	Kullanılan ortam numaraları	Ortam içeriği
LX2	Karaciğer Satellit Hücresi	Gibco, 11965092	DMEM +%10FBS +Penisilin/Streptomisin
Hep40	Hepatosellüler Karsinoma Hücresi	Gibco, 11885084	DMEM +%10FBS +Penisilin/Streptomisin

4.2.2. LX2 ve HEP40 HÜCRE HATLARINA TPEN, ZNPT VE ZNCL₂ İÇİN MTT TESTİ

LX2 ve Hep40 hücre hatları çizelge 4.1’de belirtilen şekilde muamele edilecek kimyasala göre gruplandırılmıştır. Çinko şelatörü olarak N, N, N’, N-Tetrakis (2-piridilmetil) etilendiamin (TPEN); çinkoyu hücre içine sokmak için iyonofor olarak ZnPyrrithione (ZnPT); yalnızca çinko iyonu kaynağı olarak ZnCl₂ kullanılmıştır. Kullanılan bu maddelerin hücreler için en uygun dozları değişen miktarda TPEN, ZnPT ve ZnCl₂ ile muameleden sonra yapılan MTT testi ile belirlenmiştir ve tüm deneyler bu yoğunlukların tespitinden sonra yapılmıştır.

MTT testinde Merck, Chemicon, MTT Reagent A kullanılmıştır. 96 kuyucuklu hücre tabakalarında, her bir kuyucuğuna yaklaşık 10.000 hücre ekilerek, her bir hücre hattı için 4 adet tabaka ile test başlatıldı. Her bir koşul için üç tekrar kuyucuklar hazırlandı. Konulan her bir yoğunluk grubu için hücresiz kuyucuklar içine yalnızca kullanılan hücresinin besi yeri ve ilgili kimyasal konularak test edildi.

Çizelge 4.2 Kullanılan hücre hatları ve deney grupları

Hücre Hatları	TPEN	ZnPT	ZnCl ₂
Hep40	-	-	-
	+	-	-
LX2	-	+	-
	-	-	+

4.2.3. TOTAL RNA İZOLASYONU

Total RNA izolasyonu için hücreler 6 kuyucuklu hücre tabakalarına ekilerek en az %80 konfluent olmaları beklendi. Yeterli oranda konfluent olan hücreler 37°C'DE 3 dk tripsinlenerek (TrypLE™ Select Enzyme (1X), fenol kırmızısı içermeyen, 12563029) kaldırıldıktan sonra tripsin hücre hattına uygun olarak ilgili besi yerinin eklenmesiyle inaktive edilmiştir. Ardından 1200 RPM'de 5 dk santrifüj ile pellet haline getirilmiş ardından 1X PBS ile çözdürüldükten sonra aynı koşullarda yeniden pellet haline getirilmiştir. RNA izolasyonunda NucleoSpin II kiti (MACHEREY-NAGEL, #740955,50, GERMANY) kendi protokolü izlenerek kullanılmıştır. Elde edilen RNA örneklerinin yoğunlukları ve OD260 ile OD280 değerleri Epoch (Epoch Microplate Spektrophotometer, Biotek, ABD) ile ölçülmüştür. Ardından RNA denatüre edici jelde RNA örneklerine jel elektroforezi yapılarak örneklerde degradasyon olup olmadığına ve DNA kontaminasyonu varlığı kontrol edilmiştir.

4.2.4. CDNA SENTEZİ

Hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi ProtoScript First Strand cDNA sentez kiti (New England Biolabs, ABD) ile yapıldı. Her örnek için 1µg RNA kullanıldı ve total reaksiyon 20µL içerisinde tamamlandı. Öncelikle 1µg RNA örneğine 2µL OligoDT eklendikten sonra üzeri toplam 8µL şekilde nükleazsız su ile tamamlandı. Bu karışım içerisinde RNA 70C'de 5 dk denatüre edildi. Her bir reaksiyona 2µL M-MuLV enzim karışımı ve 10µL M-MuLV reaksiyon karışımı eklendikten sonra 1 saat 42C'de cDNA sentez tepkimesi gerçekleştirildi. Ardından 80C'de 5 dk tutularak enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi.

4.2.5. TERS TRANSKRİPTAZ-POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PZR)

Kullanılan primerler çevrimiçi primer dizayn araçlarından Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) ve NCBI primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kullanılarak dizayn edildi. Kullanılan primerler tablo 4.2'de listelenmiştir. RT-PZR, kantitatif eş zamanlı PZR deneylerinde kullanılacak olan primerlerinin optimizasyon deneyleri için kullanıldı. RT-PZR reaksiyonun da One Taq Quick Load 2x master mix (New England Biolabs, ABD) kullanıldı. RT-PZR koşulları GAPDH hariç aşağıda verildiği gibidir, GAPDH 25 siklus yapıldı.

Çizelge 4.3 qRT-PZR'de kullanılan primer dizileri

Gen Adı	Ürün Uzunluğu (bp)	İleri Primer (5'-3')	Geri Primer (5'-3')	Tm (°C)
GAPDH	101	CTGGGCTACACTGAGCACC	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	60
ZİP7	110	TTGGGGCTTCCTTTTCGAGG	AGACTGGACCAAGATGGCAAA	60
ZİP8	141	ATGCTACCCAAATAACCAGCTC	ACAGGAATCCATATCCCCAAACT	60
ZİP14	135	AAGGCCCTACTCAACCACCT	CGACTGCTCGCTGAAATTGTG	60
ZNT7	113	AGCAGTTGCAAGGAGTTTACAG	CCACCTAGCATCAGCATCA	60
MTF1	135	CACAGTCCAGACAACAACATCA	GCACCAGTCCGTTTTTATCCAC	60
MMP2	112	GATACCCCTTTGACGGTAAGGA	CCTTCTCCCAAGGTCCATAGC	60
MMP12	174	GGAATCCTAGCCCATGCTTTT	CATTACGGCCTTTGGATCACT	60
MMP13	137	CCAGACTTCACGATGGCATTG	GGCATCTCCTCCATAATTTGGC	60
MT1A	217	TCCTGCAAATGCAAAGAGTG	ATGGGTCAGGGTTGTATGGA	60
MT2	121	AAAGGGGCGTCGGACAAGTG	AACGGTCACGGTCAGGGTTG	60

Çizelge 4.4 RT-PZR koşulları

Başlangıç denatürasyonu:	95°C 5 dakika	
	94°C 30 sn	30 siklus
	65°C 45 sn	
	68°C 1 dk	
Final uzama:	68°C 5 dk	

4.2.6. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

1X TAE tampon ve etidyum bromür (30ng/mL) ile hazırlanan %1 agaroz jel kullanıldı. Örnekler jele yüklenmeden kullanılan enzim karışımının içerisinde yükleme boyası bulunduğu için ayrıca bir yükleme boyası kullanılmadı. DNA cetveli olarak 100 baz çifti DNA cetveli kullanıldı (New England Biolabs, N3231S, ABD). Örnekler 100V'ta 20-25 dk arası koşturularak açıldı. Jel görüntülemeleri Chemidoc MP (Biorad, ABD) ile yapıldı.

4.2.7. KANTİTATİF EŞ ZAMANLI PZR

Kantitatif eş zamanlı PZR GoTaq qPZR master mix (Promega, A6002, ABD) kullanılarak yapıldı. Final reaksiyon hacmi 16µL olacak şekilde üreticinin protokolü izlendi. İleri ve geri primerlerden her biri 0,5µL 1pmol olarak kullanıldı. Referans gen olarak GAPDH seçildi, tüm ifade sonuçları kendi GAPDH ifade seviyelerine göre normalize edildi. QRT-PZR deneylerine başlamadan önce her primerin amplifikasyon verimliliği 1:2 seri dilüsyonlarla aşağıda verilen formül ile hesaplandı. Hesaplanan primerler tablo 4.3'te listelendi.

$$\text{Amplifikasyon verimliliği} = 2^{(-1/\text{eğim})}$$

İfade seviyeleri ölçülen genlerdeki kat değişimlerin analizleri karşılaştırmalı metot ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) ile yapıldı. Her iki hücre hattında da kontrol grupları kalibratör olarak kullanıldı. Her bir reaksiyonun sonunda erime eğrisi alınarak amplifikasyonun saflığı kontrol edildi. Kullanılan tüm primerler çizelge 4.2'de, primerlerin reaksiyon koşulları çizelge 4.4'te listelenmiştir.

Çizelge 4.5 Primer amplifikasyon verimlilikleri

Gen Adı	Amplifikasyon Verimliliği
GAPDH	1,95
ZİP7	1,82
ZİP8	1,92
ZİP14	1,95
ZNT7	1,99
MTF1	1,86
MMP2	1,92
MT1A	1,96
MT2	1,78

4.2.8. TOTAL PROTEİN İZOLASYONU

Hücreler 1X PBS içerisinde kazandıktan sonra 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek pellet haline getirildi, ekstrasellüler proteinleri korumak için tripsinizasyon uygulanmadı. Total protein izolasyonu, hücre pelleti lizis tampon (Ek-1) içerisinde, her bir örnek için yaklaşık 100µL, yeniden çözdürülmesiyle yapıldı. Süspansiyon haline getirilen hücre pelleti lizisin gerçekleşmesi için 30 dk buz üzerinde, her 10 dk'da bir karıştırılarak, inkübe edildi.

İnkübasyon tamamlandıktan sonra hücre lizatları sıcaklığı 13.000 RPM, +4°C'de 20 dk santrifüj edildi. Tüplerden toplanan, total proteinin bulunduğu süpernatantlar toplandı. Protein yoğunlukları BCA Assay Kit (Thermo Fisher, ABD) kullanılarak üretici protokolüne uygun olarak ölçüldü.

Çizelge 4.6 Kullanılan primerlerin PZR koşulları

Gen Adı	Aktivasyon	Denatürasyon	Tavlama/Uzama	Ayrılma	Siklus
GAPDH	95°C, 2dk	95°C, 15 sn	60°C, 60 sn	95°C	45
ZİP7	95°C, 2dk	95°C, 15 sn	60°C, 60 sn	95°C	45
ZİP8	95°C, 2dk	95°C, 15 sn	60°C, 60 sn	95°C	45
ZİP14	95°C, 2dk	95°C, 15 sn	60°C, 60 sn	95°C	45
ZNT7	95°C, 2dk	95°C, 15 sn	60°C, 60 sn	95°C	45
MTF1	95°C, 2dk	95°C, 15 sn	60°C, 60 sn	95°C	45
MMP2	95°C, 2dk	95°C, 15 sn	60°C, 60 sn	95°C	45
MMP12	95°C, 2dk	95°C, 15 sn	60°C, 60 sn	95°C	45
MMP13	95°C, 2dk	95°C, 15 sn	60°C, 60 sn	95°C	45
MT1A	95°C, 2dk	95°C, 15 sn	60°C, 60 sn	95°C	45
MT2	95°C, 2dk	95°C, 15 sn	60°C, 60 sn	95°C	45

4.2.9. SDS-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

Protein örnekleri jele yüklenmeden önce %10 β-merkaptoetanol (Sigma, ABD) içeren 2X ayırma tamponu içerisinde, 95°C 7-10 dk denatüre edildi. Protein örneklerinin, %10 ayırıcı jel ve %5 paketleyici jelde 85V'da koşturularak ayrılmaları sağlandı. Protein örnekleri 20 µg yüklendi. 3 µL renkli protein cetveli (BLUeye Prestained Protein Ladder, GeneDireX, ABD) kullanıldı.

4.2.10. PVDF MEMBRANA PROTEİN TRANSFERİ

Jelden PVDF membrana protein transferi için BioRad Turbo Transfer cihazı kullanıldı. Transferde kullanılan watman kâğıtları, PVDF membranlar ve transfer tamponu cihazın kendi sarf malzeme kiti olan Biorad RTA kitten () kullanıldı.

4.2.11. PVDF MEMBRANA İMMOBİLİZE EDİLMİŞ PROTEİNLERİN İMMÜNOLOJİK SAPTAMASI

PVDF membrana protein transferi gerçekleştikten sonra membran bloklama çözeltisi (Ek-1) içerisinde 1 saat çalkalamaya bırakılarak bloklandı. Bloklama tamamlandıktan sonra ilgili primer antikora, uygun dilüsyon hazırlanarak, bir gece +4°C’de çalkalanarak inkübe edildi. Ertesi gün 3 kere 1X TBS-(0.3%) tween (Ek-1) içerisinde her biri 15 dk olan yıkamalar tamamlandı. Primer antikor yıkamasından sonra ilgili antikora uygun HRP-sekonder antikor uygun dilüsyonda membrana döküldükten sonra 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda sekonder antikor yıkaması, primer antikor yıkamasına uygun olarak 3 kere 1X TBS-(0.3%) tween ile yapıldı. Kemilimünesans olarak Pierce ECL Western Blotting substratı (Thermo Fischer Scientific, 32106, ABD) kullanılmıştır. Görüntülemeler Chemidoc MP (Biorad, ABD) ile yapılmıştır. Kullanılan primer antikorlar tablo 4.5’te, sekonder antikorlar 4.6’da listelenmiştir.

4.2.12. HÜCRE İÇİ BAZAL ÇİNKO SEVİYESİNİN ÖLÇÜLMESİ

Hücre içi bazal çinko seviyesini ölçmek için FluoZin-3, AM (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. FluoZin-3, AM, Zn^{+2} ’ya duyarlı flüoresanli bir boyadır. Deneylede TPEN için 10^{-7} , ZnPT için 10^{-8} ve $ZnCl_2$ için 10^{-7} 18 saatlik inkübasyonları tamamlandıktan sonra hücre grupları HEPES banyo solüsyonuyla iki kere yıkandı. Boyanın stok solüsyonundan seyreltilerek hazırlanan $3\mu M$ FluoZin-3, hücrelere verildi. 1 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra hücrelerin bazal çinko seviyesi konfokal mikroskopu kullanılarak ölçüldü (Leica, SP5). Flüoresan yoğunluğu 1Hz, 490nm dalga boyuyla uyarılmış ve 525nm’de toplanmıştır. Görüntü analizi için Leica’nın LasX yazılımı kullanıldı. Sabit durumdaki flüoresan yoğunluğu (F) ölçüldükten sonra en yüksek (F_{max}) ve en düşük (F_{min}) çinko oranları da ölçülerek hücre içi serbest çinko yoğunluğu hesaplanır.

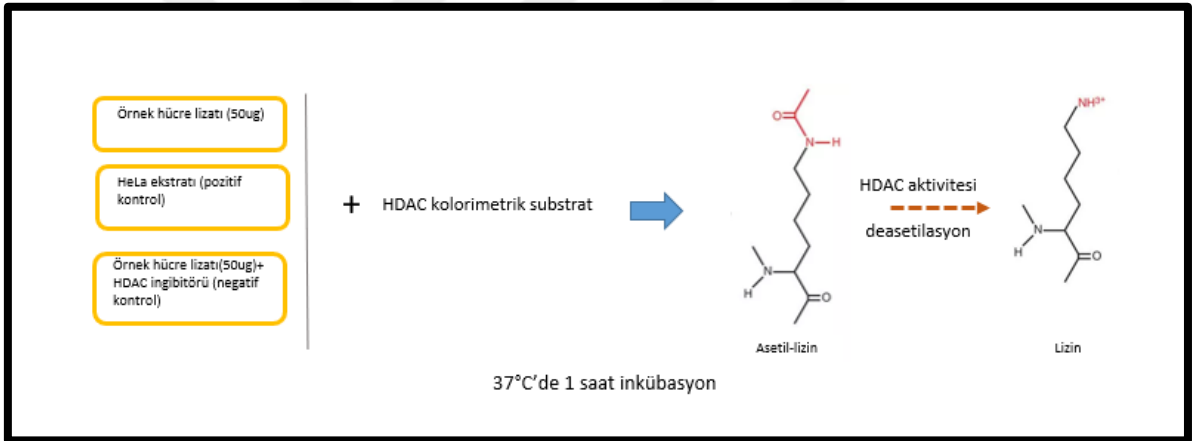
$$[Zn^{+2}] = K_d [(F-F_{min}) / (F_{max}-F)]$$

FluoZin-3’ün K_d ’si 15 nM’dır. En yüksek flüoresan yoğunluğunun kaydedilmesi için HEPES banyo solüsyonu içerisindeki hücreler $10\mu M$ verilen 1-hidroksipiridin-2-tiyonin, Zn^{2+} -pritan tuz solüsyonu verildi. En düşük flüoresan yoğunluğunun kaydedilmesi için ise

50 μM Zn^{2+} şelatörü N, N, N', N'-tetrakis(2-piridilmethyl) etilendiamin (TPEN) solüsyonu verildi.

4.2.13. HİSTON DEASETİLİZ (HDAC) AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ

HDAC aktivitesinin ölçülmesi için kolorimetrik HDAC test kiti (Biovision, K331) kullanılmıştır. HDAC aktivitesi olan hücre ekstratlarına (örneklere ve kontroller) başlangıçta asetilenmiş lizin yan zincir içeren substrat eklendi. HDAC aktivitesi substrat bağlanarak 1 saat boyunca 37°C 'de faaliyet gösteriyor. Substratta bu sürede meydana gelen deasetilasyonu tespit etmek için örneklere ve kontrollere lizin developman solüsyonu eklendi. Lizin developman solüsyonu ile deasetile edilmiş substrat birleşerek 400-405nm aralığında okuma alınabilen kromofor yapısını oluşturuyor. Bu sayede ELISA okuyucuya konulan 96 kuyucuklu tabakadan okuma alındı ve örneklerdeki total HDAC aktivitesi ölçüldü.



Şekil 4.1 HDAC aktivitesi ölçümünün moleküler mekanizması

4.2.14. KROMATİN İMMÜNOPRESİPİTASYON

Kromatin immünopresipitasyon metodunda SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP kit Magnetic Beads (Cell Signaling Technology, ABD) kullanıldı. Kit protokolü birebir takip edilerek yapıldı.

4.2.14.1. İn Vitro Kromatin Çapraz Bağ Oluşturulması Ve Parçalanması

Deneylerde TPEN için 10^{-7} , ZnPT için 10^{-8} ve ZnCl_2 için 10^{-7} 18 saatlik inkübasyonları tamamlandıktan sonra hücre besi yerlerinin içindeki %40 formaldehidin final konsantrasyonu %1 olacak şekilde gerekli formaldehid miktarı hesaplandı ve besi yerlerine

ekledi. Böylelikle kromatinlerin çapraz bağ oluşturması sağlandı. 10dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra besi yerinin üzerine 2mL 10X glisin solüsyonu ekledi, 5dk daha oda sıcaklığında inkübe edildi. Formaldehid ve glisin içeren hücre besi yeri tamamen çekildi ve hücreler 20mL soğuk 1X PBS ile iki kere yıkandı. Yıkanan hücrelerin üzerine 2mL proteaz inhibitör kokteyli içeren soğuk 1X PBS eklendi ve hücreler tabaktan kazındı. Kazınan hücreler 15mL'lik tüpe alınarak 4C'de 1500 rpm'de 5dk santrifüj edilerek pellet haline getirildi. Hücrelerin üzerinden süpernatant dikkatlice çekilip pellet 1mL soğuk tampon A, ditiotritol ve proteaz inhibitör kokteyl karışımı içinde çözüldü, 4C'de 3000 rpm'de 10dk santrifüj edilerek pellet haline getirildi. Hücrelerin üzerinden süpernatant dikkatlice çekildi. Pellet 1mL soğuk tampon B ve ditiotritol karışımı içinde çözümlenerek 4C'de 3000 rpm'de 10dk santrifüj edilerek pellet haline getirildi. Pellet 100uL soğuk tampon B ve ditiotritol karışımı ile çözüldükten sonra içerisine 0,25uL mikrokokal nükleaz eklendi, 37C'de 15dk inkübe edilerek kromatinlerin parçalanması sağlandı. İnkübasyonun sonunda 10uL 0,54M EDTA eklenerek enzim aktivitesi durduruldu. Hücreler 4C'de 13000 rpm'de 1dk santrifüjlenerek pellet haline getirildi. Pellet 100uL proteaz inhibitör kokteyli içeren 1X ChIP tampon solüsyonunda çözüldü. Sonikasyon, 30 saniye sonikasyon titreşimi ardından 30 saniye buzlu suda bekleme şeklinde toplam 8 set tekrar edildi. Böylelikle kromatin yapısının parçalanması tamamlandı. Sonike edilmiş örnek 4C'de 10000 rpm'de 10dk santrifüj edildi, hücre debrisleri pellet haline getirildi. Santrifüj sonunda parçalanmış kromatin içeren süpernatant dikkatlice çekilerek yeni tüpe alındı.

4.2.14.2. Parçalanmış Kromatinin Analizi Ve Konsantrasyon Ölçümü

100 µl parçalanmış kromatin içeren tüpten 25 µl alınarak üzerine 6 µl 5 M NaCl ve 2 uL RNase A eklendikten sonra 30°C'de 30dk inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda içerisine 2uL proteinaz K eklendi ve 65°C'de 2 saat inkübe edildi. Bu şekilde formaldehitte oluşturulmuş çapraz bağlar bu şekilde tersine çevrildi ve elde edilen DNA kit protokolüne uygun olarak saflaştırıldı. DNA konsantrasyonu Epoch (Epoch Microplate Spektrophotometer, Biotek, ABD) ile ölçüldü. Saflaştırılmış DNA örneklerinden 5 µl alındı üzerin 5 µl yükleme boyası eklenerek %1'lik agaroz jele yüklendi, jel elektroforezi yöntemi ile parçalanmış kromatinlerin boyutları kontrol edildi. Kromatinler 1 ila 5 nükleozoma denk gelecek şekilde yaklaşık 150-900bp arasında parçalanmış olmalı.

4.2.14.3. Kromatin İmmünopresipitasyonu Ve DNA Saflaştırılması

10 µg kromatin DNA örneğinin üzerine toplam 500 µl olacak şekilde 1X ChIP tamponu eklendi. Bu karışımdan 10 µl örnek (girdi örneği) qPCR hesaplamalarında normalizasyon için kullanılmak üzere ayrılarak -20C'ye kaldırıldı. İmmünopresipitasyonu (İP) için her 500 µl'lik örneğe 2 µg olacak şekilde HDAC4 antikoru tüplere eklendi. DNA, 1X ChIP tamponu ve primer antikor içeren tüpler çeviriciye yerleştirilerek 4C'de bir gece inkübe edildi. Takip eden günde tüplerin içerisine, her 500 µl'ye 30 µl olacak şekilde magnetik boncuklar eklendi ve çevirici üzerinde 4C'de 2 saat inkübe edildiler. Yıkama aşamaları kit protokolüne uygun olarak tamamlandı. Magnetik boncukların üzerine bağlanmış DNA ve ona bağlı HDAC4 antikorundan oluşan yapıların boncuklardan ayrıştırılması için her reaksiyona ve önceki gün ayırdığımız girdi örneklerine 150 µl 1X ChIP ayrıştırma tamponu eklendi. Ayrıştırma, örnekler ve girdi örnekleri ısıtıcı karıştırıcıya konularak 65C'de 1200 rpm'de 30dk inkübe edilerek tamamlandı. Magnetik boncuklar, magnetik standı konularak pellet haline getirildikten sonra süpernatantta bulunan ayrıştırılmış IP reaksiyonları ile girdi örnekleri dikkatlice çekilerek yeni tüplere alındı. Formaldehitte oluşturulmuş çapraz bağları tersine çevirmek için örneklere ve girdi örneklerine 6 µl 5M NaCl ve 2 µl proteinaz K eklendi, 65C'de 2 saat daha inkübe edildiler. DNA saflaştırılması kit protokolüne uygun olarak kitin kendi DNA kolonları kullanılarak tamamlandı ve DNA ayrıştırması 35 µl ayrıştırma tamponu ile tamamlandı.

4.2.14.4. İmmünopresipitasyonu Yapılmış DNA Örneklerinin qRT-PZR İle Kantitasyonu

ChIP metodunun analizi qRT-PZR ile GoTaq qPZR master mix (Promega, A6002, ABD) kullanılarak yapıldı. Sonuçlar yüzde-girdi normalizasyon metoduyla değerlendirildi.

$$\% \text{ girdi} = (\text{primer verimliliği})^{\text{(CT-girdi örneği-CT IP örneği)}}$$

HDAC4'ün MMP2, MMP12, MMP13, MT1 ve MT2 genleri üzerine bağlanması, her örnek grubu için % girdi değerlerinin ortalamasının alınmasıyla hesaplandı. Çizelge 4.3'te listelenmiş primerler, çizelge 4.4'te belirtilen koşullarda qRT-PZR'de kullanıldı. Her reaksiyonun sonunda erime eğrisi kontrol edilerek amplifikasyonun saflığı kontrol edildi.

4.2.15. İMMÜNOFLORESAN BOYAMASI

LX2 ve Hep40 hücreleri her kuyucuğa 50000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre tabaklarına konan steril lamellerin üzerine ekildiler. İki hücre grubu için de TPEN için 10^{-7} , ZnPT için 10^{-8} ve $ZnCl_2$ için 10^{-7} 18 saatlik inkübasyonları tamamlandıktan sonra hücreler bir kere 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon için soğuk metanol eklenen hücreler $-20C$ 'de 10dk inkübe edildi. Fiksasyon tamamlandıktan sonra hücreler iki kere 1X PBS-T ile yıkandılar. Sonrasında hücreler 1X PBS-T içerisinde oda sıcaklığında 10dk inkübe edildiler. PBS-T çekildikten sonra hücrelerin üzerine bloklama solüsyonu eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildiler. Bloklamanın ardından hücrelerin üzerinden bloklama solüsyonu çekildi ve lamelin üzerine 100 uL, 1:100 dilüsyonda hazırlanmış, primer antikorlar (Zip7, Zip14, Zip8 ve ZnT7) eklendi. Tüm primer antikorlar MyBiosource'tan temin edildi (San Diego, Kaliforniya, ABD). Primer antikor inkübasyonu $4C$ 'de bir gece boyunca yapıldı. Takip eden gün, primer antikorlar hücrelerin üzerinden çekildikten sonra hücreler 2 kere 1X PBS-T ile yıkandılar. Primer antikorlara uyumlu, FITC işaretli sekonder antikor (Alexa Fluor 488, ThermoFisher Scientific) lamellerin üzerine eklendikten sonra oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildiler. İmmünofloresan fotoğrafları Carl Zeiss A1 floresan mikroskopunda çekildi (Oberkochen, Almanya). FITC ve DAPI boyamalarına uygun olarak 488 ve 359nm dalga boylarında görüntüleme yapıldı.

İmmünofloresan fotoğraflarının analizi için ImageJ (NIH) yazılımı kullanıldı ve analiz düzeltilmiş total hücre floresanı formülüne uygun olarak yapıldı. ImageJ programı açıldıktan sonra ölçüm ayarları sekmesinden alan, entegre edilmiş yoğunluk, ortalama ve standart sapma değerleri seçildi. Analiz yapılacak fotoğraf ImageJ ile açıldıktan sonra analiz sekmesinden ölç komutu verildi. İlk alınan ölçüm değerlerinde entegre edilmiş yoğunluk değeri fotoğrafta bulunan hücrelerin floresan yoğunluk değerini veriyor. Arka plan yoğunluğunun değerinin ölçümü için hücre sınırlarına yakın alanlardan, her fotoğraf için toplam 15 bölge olacak şekilde arka plan bölgeleri seçilerek her biri için yeniden ölçüm alındı. Arka plan değerlerinin ortalaması fotoğrafın ortalama arka plan yoğunluk değeri için kullanıldı. Düzeltilmiş total hücre floresan formülünde ölçüm değerleri yerine konarak total hücre floresanı yoğunluğu ölçüldü.

Düzeltilmiş Total Hücre Floresanı = Entegre Edilmiş Yoğunluk – (Alan x Arka Plan yoğunluk ortalaması)

4.2.16. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir. Yapılan çalışmalarda, deneysel grupların kontrole göre kıyaslamasında bağımsız örneklem t testi kullanılmıştır (GraphPad Software, Inc.). P-değeri için $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Anlamlılık derecelendirmesi $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ şeklinde ifade edilmiştir.

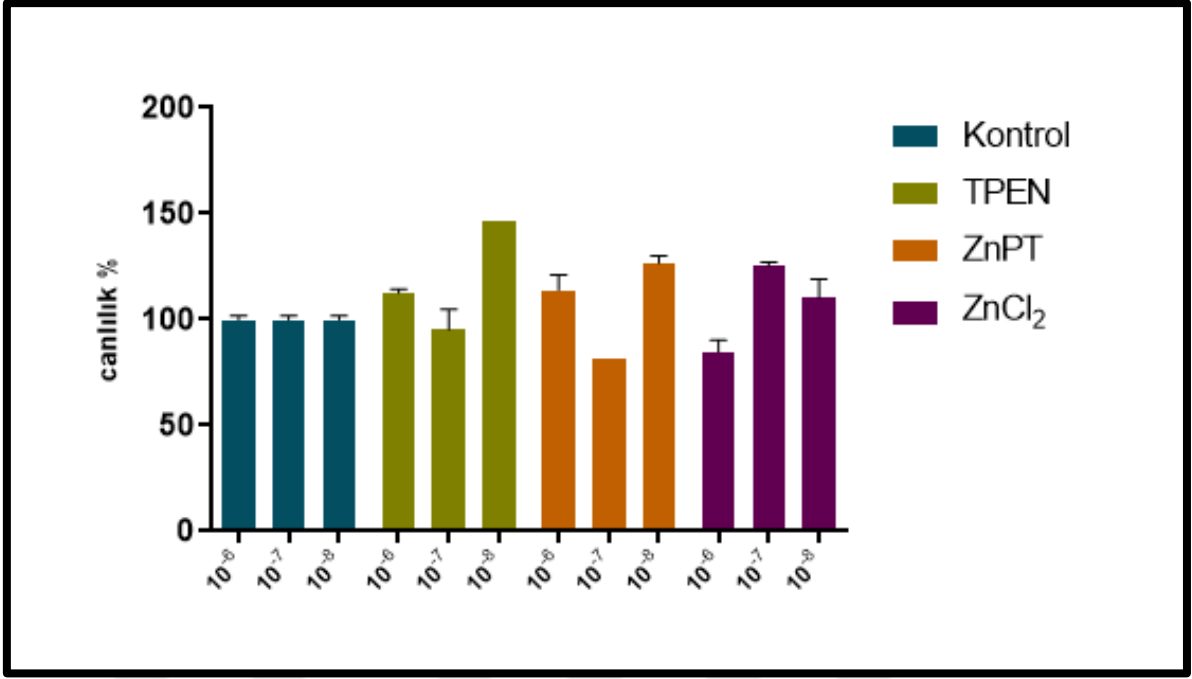


5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışmasında çinkonun karaciğer fibrozu ve sirozu takip eden hepatoma üzerindeki genetik ve epigenetik etkisi araştırılmıştır. Çalışmaların tamamında insan fibrotik karaciğer hattı LX2 ile insan hepatoselüler karsinoma hattı Hep40 kullanılmıştır. Hücre hatlarının besi yerlerine yapılan canlılık testi sonucunda uygun konsantrasyonları belirlenen TPEN, ZnPT ve ZnCl₂ eklenerek hücre içi çinko yoğunluklarında varyasyonlar oluşturulmuştur. Çinkonun genetik etkisi, MTF-1 transkripsiyon faktörünün aktive ettiği Zip7, Zip8, Zip14 ve ZnT7 çinko kanal proteinlerinin transkript ve protein seviyesindeki değişikliklere bakılarak incelenmiştir. Bahsi geçen kanal proteinlerine promotor bölgelerindeki MRE sekansının varlığına bakılarak karar verilmiştir. MRE sekansı MTF-1'in bağlanıp genin aktivasyonunu sağladığı konsensüs sekansıdır. Çinkonun epigenetik etkisi ise Zn²⁺ ile aktivitesi artan HDAC proteinlerinin aktivite değişimi ve HDAC4'ün fibroz oluşumunda rolü olan MMP2, MMP13, MT1 ve MT2 genlerine bağlanmasının kromatin düzeyinde incelenmesiyle araştırılmıştır.

5.1. MTT CANLILIK TESTİ İLE TPEN, ZNPT VE ZNCL₂ KONSANTRASYONLARINA KARAR VERİLMESİ

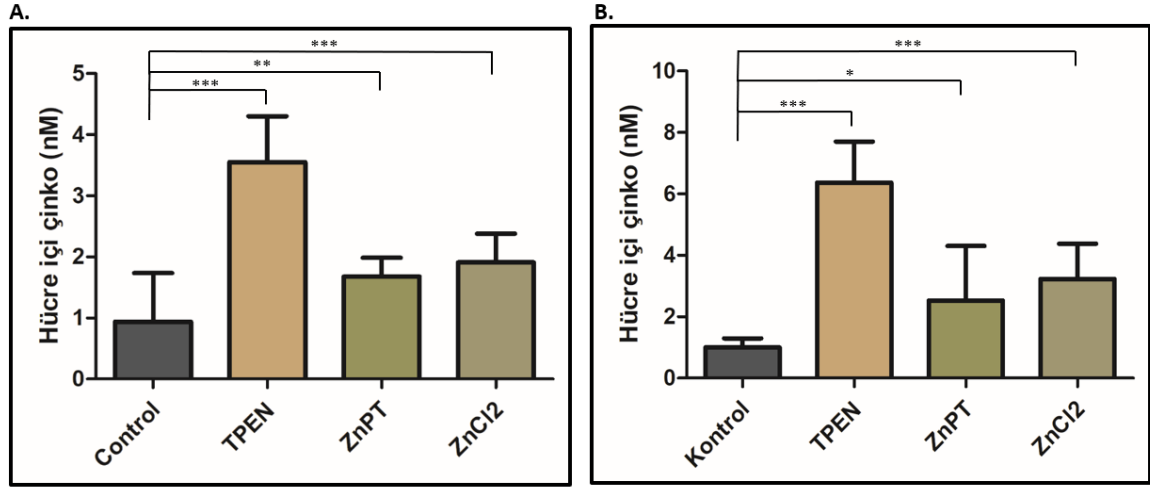
MTT canlılık testinde, hücrelerin NADPH'a bağımlı oksidoredüktaz enzimlerinin aktivitesi ölçülerek canlılıklarına karar verilmektedir. Bu enzimlerin MTT testinde kullanılan 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromidefor boyasını yıkma özelliği olduğundan .yıkılan boyadan açığa çıkan formazan ile hücrelerin canlılık oranının kolorimetrik olarak ölçümü alınmaktadır. MTT canlılık test kiti (Millipore, CT02), üretici firmanın protokolü kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler ZnPT, TPEN ve ZnCl₂ kimyasallarının her biri ile 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ yoğunluklarında 18, 24, 36 ve 48 saatlik inkübasyonlara tabii tutuldu. Yapılan canlılık testinin sonuçları değerlendirildikten sonra LX2 ve Hep40 hücre hatlarında TPEN için 5x10⁻⁷ M, ZnPT için 10⁻⁸ M ve ZnCl₂ için 10⁻⁷ M yoğunluklarında kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1 LX2 hücre hattı için yapılan canlılık testi % grafiği (10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M).

5.2. HÜCRE İÇİ SERBEST ÇİNKO SEVİYESİ DEĞİŞİMLERİNİN SAPTANMASI

Hücre içi bazal Zn²⁺ seviyesini ölçmek için yalnızca hücre içerisindeki serbest Zn²⁺ya bağlanan FluoZin-3, AM (Thermo Scientific, ABD) boyası kullanılmıştır. TPEN, ZnPT ve ZnCl₂ için MTT canlılık testi sonrasında karar verilen konsantrasyonlar kullanılmıştır. Üç deney grubunda da 18 saatlik inkübasyon sonrasında hücre içi serbest çinko seviyesinde anlamlı artış görülmüştür (Şekil 5.2 A-B). Çinko şelatörü olan TPEN uygulaması hücre içi serbest Zn²⁺ konsantrasyonunu azaltmamış ve tam tersi bir sonuç vermiştir. Deney gruplarımız arasında iki hücre hattı için de en fazla Zn²⁺ artışı (p<0,001***) 18 saatlik, 5x10⁻⁷ M TPEN uygulaması ile ortaya çıkmıştır.



Şekil 5.2 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerinin hücre içi serbest Zn²⁺ değişimleri, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$.

5.3. ZIP7, ZIP8, ZIP14 VE ZNT7 KANAL PROTEİNLERİNİN İFADESİNİN TRANSKRİPT DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

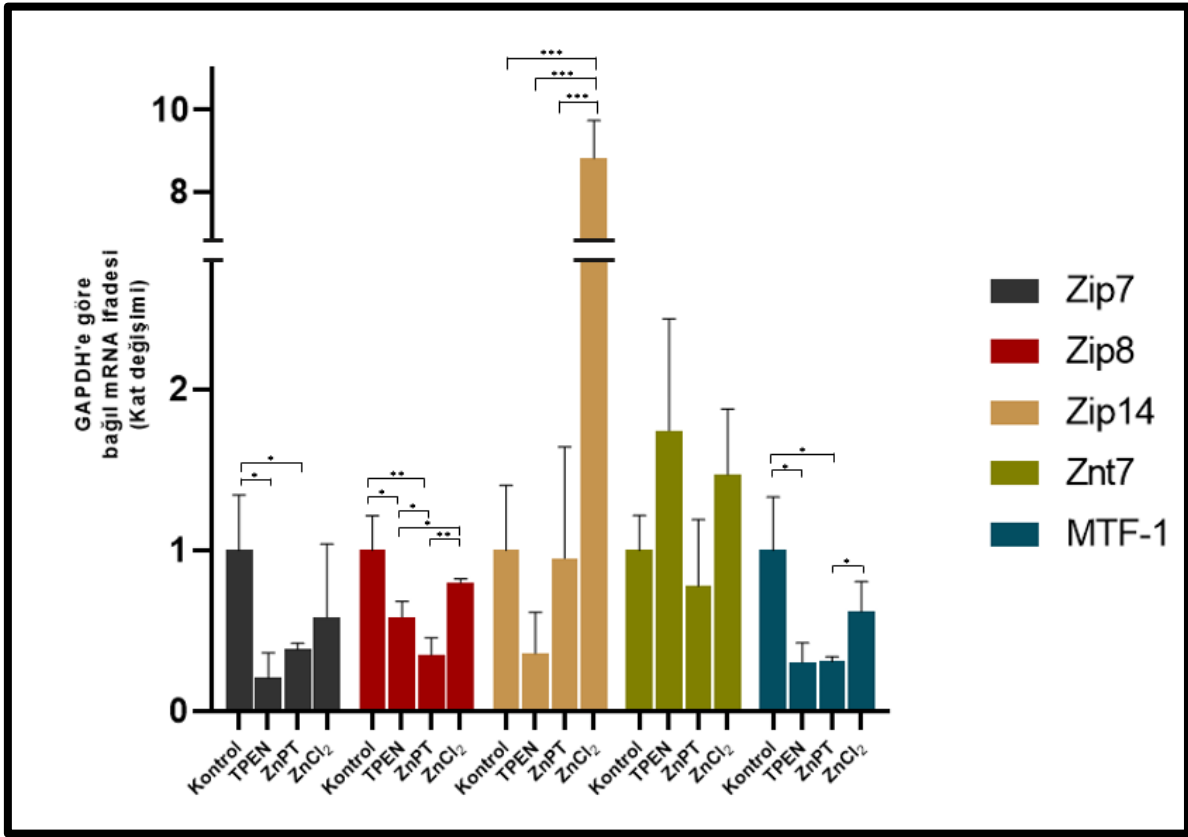
Yoğun olarak hücre zarı üzerinde bulunan Zip8 ve Zip14, çekirdek zarı ve endoplazmik retikulum üzerinde yoğun olarak bulunan Zip7 ve golgi aygıtı ile endoplazmik retikulumda bulunan ZnT7 çinko kanal proteinlerinin promotor bölgelerinde MRE konsensüs sekansları tespit edilmiştir (Şekil 5.3). Bu sebeple bu genlerin ifadeleri çinkonun hücrel genetik etkisinin incelenmesi için seçilmişlerdir. TPEN, ZnPT ve ZnCl₂ muamelesi ile hücre içi Zn²⁺ konsantrasyonundaki meydana getirdiğimiz anlamlı artışın ardından Zip7, Zip8, Zip14 ve ZnT7'nin mRNA seviyesindeki değişimi qRT-PZR ile inceledik. Ayrıca MRE konsensüs sekansına bağlanan MTF-1 transkripsiyon faktörünün mRNA seviyesindeki değişimini de qRT-PZR ile inceledik. Referans gen olarak ise GAPDH geni kullanımıdır.

Çizelge 5.1 Zip7, Zip8, Zip14 ve ZnT7 genlerinde bulunan MRE konsensüs sekansları ve bölgeleri

Genler	Bölge (-bp)	Motif
	-1691	TGCACAC
Zip7	-2801	TGCACAC
	-1876	TGCACAC
	-1859	TGCACAC
Zip8	-1851	TGCACAC
	-1958	TGCACAC
	-4992	TGCACAC
	-2316	TGCACAC
	-2573	TGCACAC
Zip14	-2470	TGCACAC
	-2459	TGCACAC
ZnT7	-3876	TGCACAC
	-3993	TGCACAC

LX2 hücrelerinde TPEN ve ZnPT uygulaması sonrası Zip7, Zip8 ve Zip14 genlerinin ifadelerinde azalma olduğu görülmektedir. Zip7 ve Zip8 genlerinde görülen bu azalmalar kontrole kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlıdır artışı ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$). Zip8'in mRNA seviyesinde ZnPT uygulaması sonrası görülen düşüş hem TPEN hem de ZnCl2 uygulamasının ardından meydana gelen değişimlere göre anlamlı olmuştur ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$). ZnCl2 uygulamasının ardından Zip14 geninin ifadesi kontrole göre 9 kata yakın artmıştır ve bu artış yalnızca kontrole göre değil TPEN ve ZnPT uygulanan gruplara kıyasla da anlamlıdır ($p<0,001^{***}$). ZnT7'nin mRNA seviyesinde kaydedilen değişikliklerin hiçbiri ise istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. MTF-1 mRNA seviyesindeki değişim Zip7 ve Zip8 gen ifadelerine benzemektedir. TPEN, ZnPT ve ZnCl2 uygulamalarından sonra MTF-1 ifadesinin azaldığı görülmektedir ancak ZnCl2'den sonra azalan ifade seviyesi kontrole kıyasla anlamlı olmamıştır. ZnPT uygulamasından sonra MTF-1 ifadesindeki

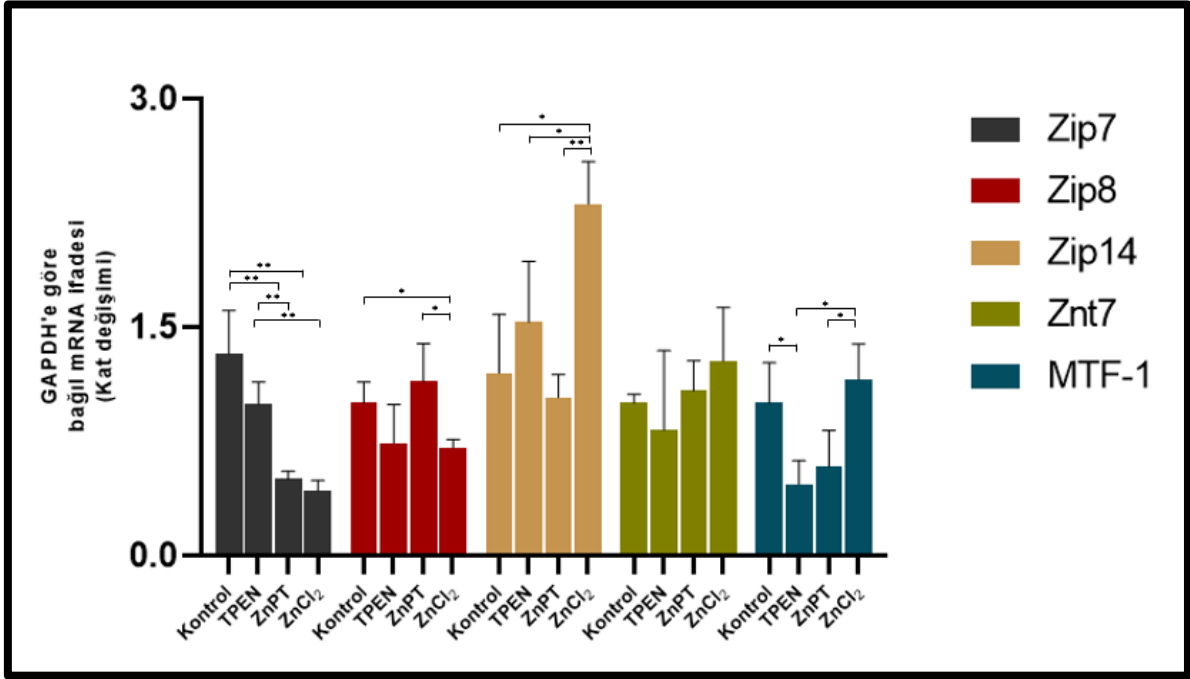
düşüş ZnCl₂ uygulamasından sonraki ifade seviyesine göre anlamlı olmuştur ($p < 0,05^*$). (Şekil 5.3).



Şekil 5.3 LX2 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn²⁺'nin Zip ve ZnT çinko kanal proteinlerinin ile MTF-1'in mRNA seviyesi üzerindeki etkisinin qRT-PZR ile incelenmesi. Bağlı mRNA ifadesi her grubun kendi GAPDH ifadesine göre hesaplanmıştır. N=3, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma.

Hep40 hücrelerinde Zip7 seviyesinde LX2 hücrelerine benzer biçimde hem TPEN hem de ZnPT uygulamasından sonra kontrole kıyasla azalma görülmektedir ancak TPEN'deki düşüş anlamlı değildir. ZnPT ve ZnCl₂ uygulamalarından sonra Zip7 ifadesi TPEN uygulanan hücelere kıyasla anlamlı biçimde azalmaktadır ($p < 0,01^{**}$). Zip8'in grafiği incelendiğinde TPEN ve ZnCl₂ uygulanan hücelerdeki ifade değişikliği LX2 hücelerine benzemektedir. Ancak Hep40 hücelerinde kontrole kıyaslandıklarında TPEN uygulaması sonrasında görülen düşüş anlamlı değilken ZnCl₂ uygulanan hücelerde görülen düşüş anlamlıdır, LX2 hücelerinde bu durumun tam tersi görülmektedir ($p < 0,05^*$). ZnPT uygulanan hücelerde her ne kadar grafik üzerinde artış görüle de bu artış anlamlı değildir. Ancak ZnCl₂ ile ZnPT uygulanan hüceler kıyaslandığında aralarındaki farkın anlamlı olduğu görülmektedir ($p < 0,01^{**}$). Zip14'ün mRNA seviyesi ZnCl₂ uygulamasından sonra kontrole kıyasla LX2

hücrelerindeki kadar yüksek olmasa da artış göstermektedir ($p<0,001^{***}$). $ZnCl_2$ uygulamasından sonra görülen artış TPEN ve ZnPT uygulanan gruplarla kıyaslandığında da anlamlıdır ($p<0,05^*$). MTF-1 ifadesinde TPEN uygulamasından sonra kontrole kıyasla anlamlı bir düşüş görülmektedir ($p<0,05^*$). $ZnCl_2$ uygulamasından sonra ise MTF-1'in mRNA seviyesinde artış olduğu görülmektedir ancak bu artış kontrole göre anlamlı değildir; TPEN ve ZnPT uygulanan gruplara kıyasla anlamlıdır ($p<0,05^*$) (Şekil 15.4).



Şekil 5.4 Hep40 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn^{2+} 'nin Zip ve ZnT çinko kanal proteinlerinin ile MTF-1'in mRNA seviyesi üzerindeki etkisinin qRT-PZR ile incelenmesi. Bağıl mRNA ifadesi her grubun kendi GAPDH ifadesine göre hesaplanmıştır. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma

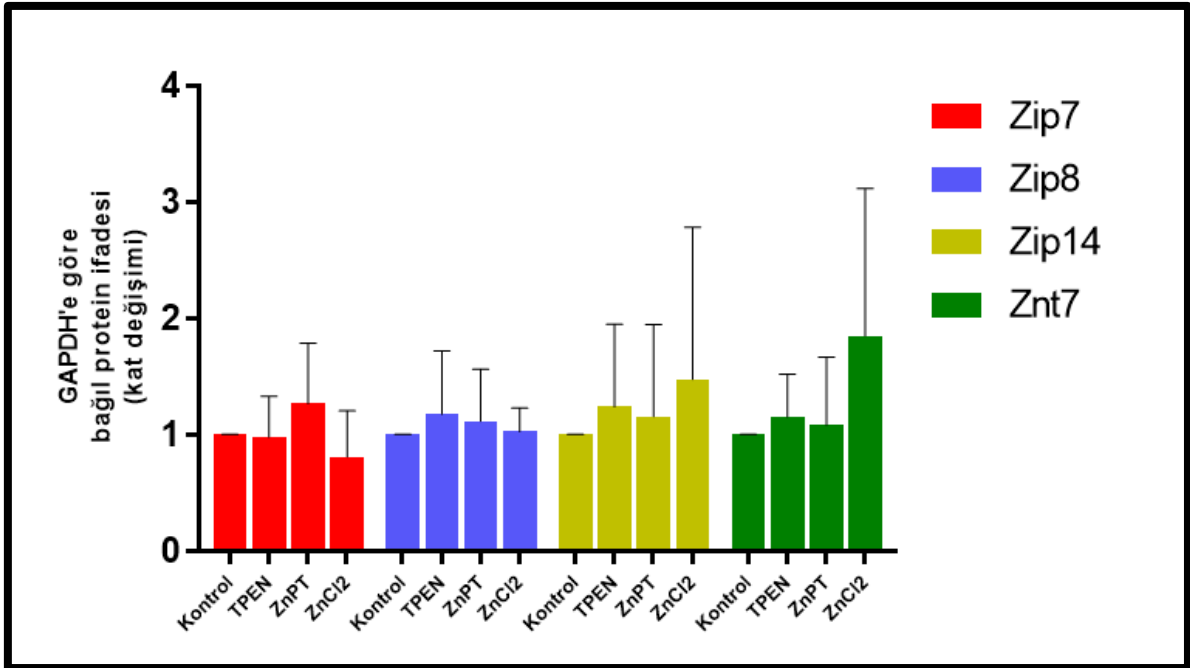
5.4. ZİP7, ZİP8, ZİP14 VE ZNT7 KANAL PROTEİNLERİNİN İFADESİNİN PROTEİN DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

TPEN, ZnPT ve $ZnCl_2$ muamelesi ile hücre içi Zn^{2+} konsantrasyonundaki meydana getirdiğimiz anlamlı artışın ardından transkript seviyesinde değişimlerini incelediğimiz Zip7, Zip8, Zip14 ve ZnT7 kanal proteinlerinin protein ifadesindeki değişimlerini de inceledik. Bunun için hem western blot hem de immünofloresan tekniklerini kullandık. Western blot için beta-actin ve/veya GAPDH genleri referans gen olarak kullanıldı ve normalizasyonları bu genlerin ifadelerine göre yapıldı. İmmünofloresan sonuçları ise her

görüntü kendi arka plan ortalaması ve alanı ile analiz edilmiştir. Yapılan western blot çalışmalarının bant görüntüleri ek-5'te verilmiştir.

5.4.1. WESTERN BLOT SONUÇLARI

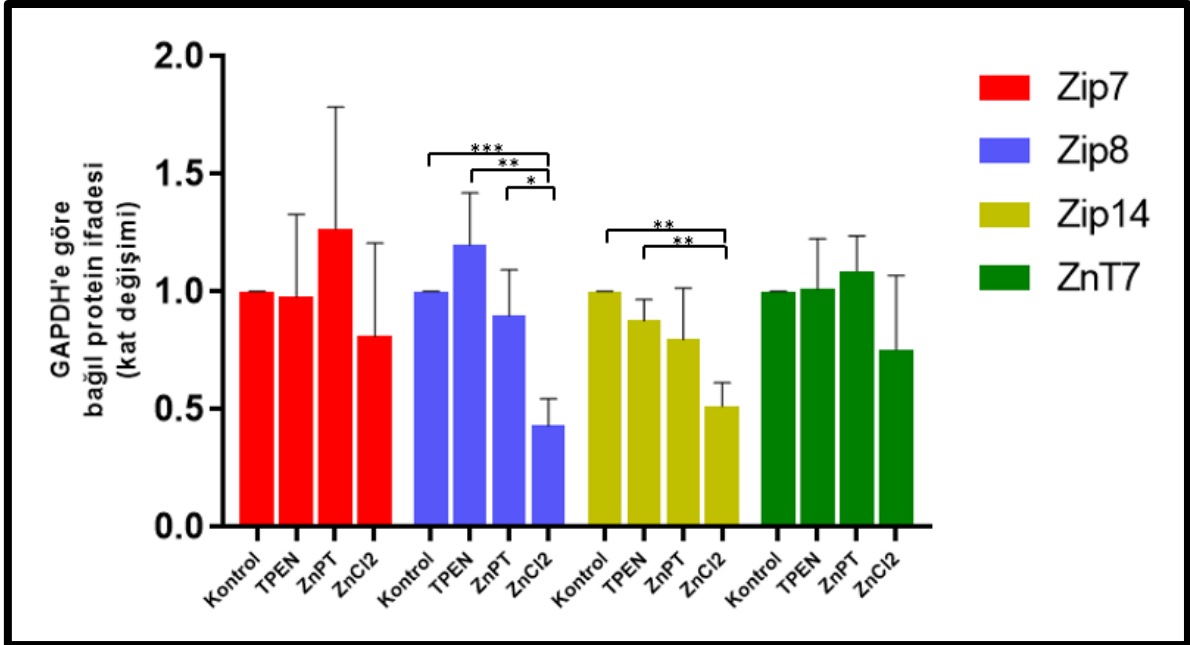
Zip7, Zip8, Zip14 ve ZnT7 çinko kanal proteinlerinin hücre içi farklı Zn²⁺ konsantrasyonlarında protein seviyesindeki değişimleri incelendiğinde LX2 hücre hattında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Zip proteinlerinin grafik eğilimleri mRNA seviyelerini gösteren grafiklerin eğilimlerinden farklıdır; ZnT7'nin ise mRNA ve protein ifadelerinin grafik eğilimleri benzer olsa da anlamlı bir değişiklik bulunmamaktadır (Şekil 5.5).



Şekil 5.5 LX2 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn²⁺'nin Zip ve ZnT çinko kanal proteinlerinin protein seviyesindeki etkisinin western blot ile incelenmesi. Normalizasyonlar için beta-aktin ve GAPDH referans gen olarak kullanılmıştır. Protein seviyesindeki değişiklikler kat değişimi şeklinde hesaplanmıştır. N=3, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, Ortalama \pm Standart Sapma

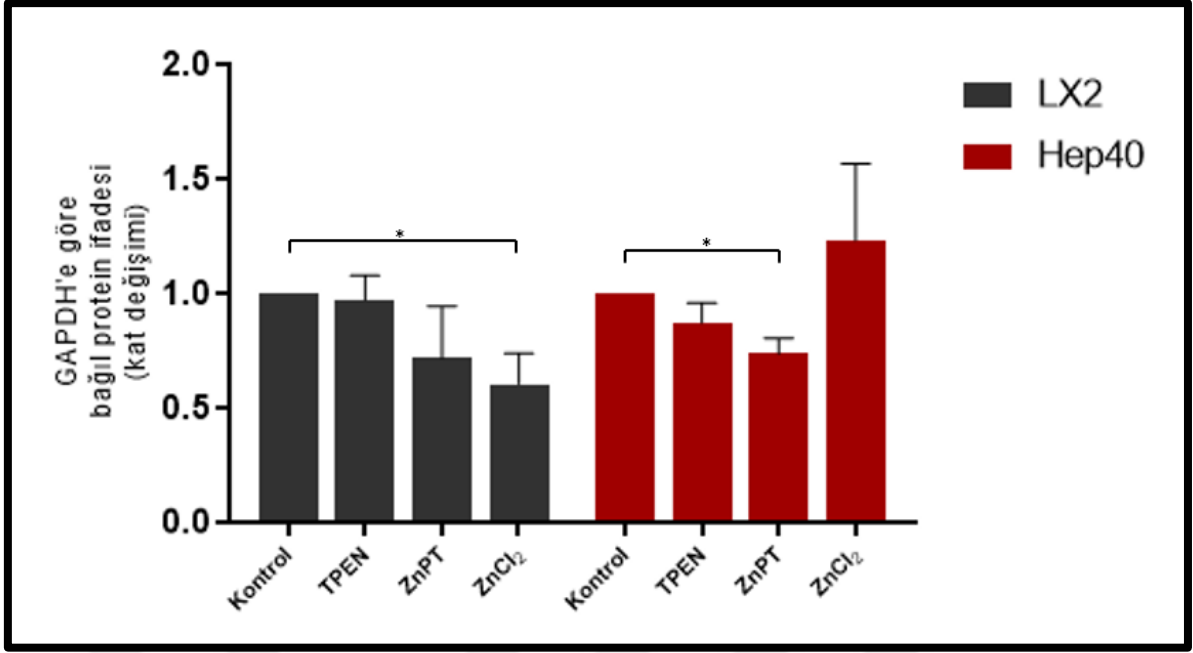
Hep40 hücrelerinde ise Zip8 ve Zip14 protein ifadelerinde anlamlı değişiklikler bulunmaktadır. Deney grupları ZnPT-ZnCl₂ ve TPEN-ZnCl₂ şeklinde kendi aralarında kıyaslandığında TPEN veya ZnPT uygulanan hücrelerde Zip8 protein ifadesinin ZnCl₂ uygulananlara kıyasla anlamlı biçimde fazla olduğu görülmektedir ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$). ZnCl₂ uygulanan grup kontrolle kıyaslandığında ise Zip8 ifadesinde anlamlı bir düşüş olduğu görülmektedir ($p < 0,001^{***}$). TPEN uygulaması yapıldığında Zip8'in mRNA seviyesinde anlamlı bir azalma görmüşken protein seviyesinde anlamlı olmamakla birlikte

tam tersi bir artış olduğu görülmektedir. Zip14 protein ifadesindeki değişim de Zip8 ile oldukça benzerdir ancak ZnPT ile ZnCl₂ kıyaslandığı zaman Zip14'teki değişik anlamlı değildir. ZnT7'nin protein seviyesindeki değişiklikler anlamlı değildir. Ayrıca mRNA ifadesindeki değişikliklerle de benzer değildir (Şekil 5.6).



Şekil 5.6 Hep40 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn²⁺'nin Zip (A, B, D) ve ZnT (C) çinko kanal proteinlerinin protein seviyesindeki etkisinin western blot ile incelenmesi. Normalizasyonlar için GAPDH referans gen olarak kullanılmıştır. Protein seviyesindeki değişiklikler kat değişimi şeklinde hesaplanmıştır. N=3, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, Ortalama \pm Standart Sapma

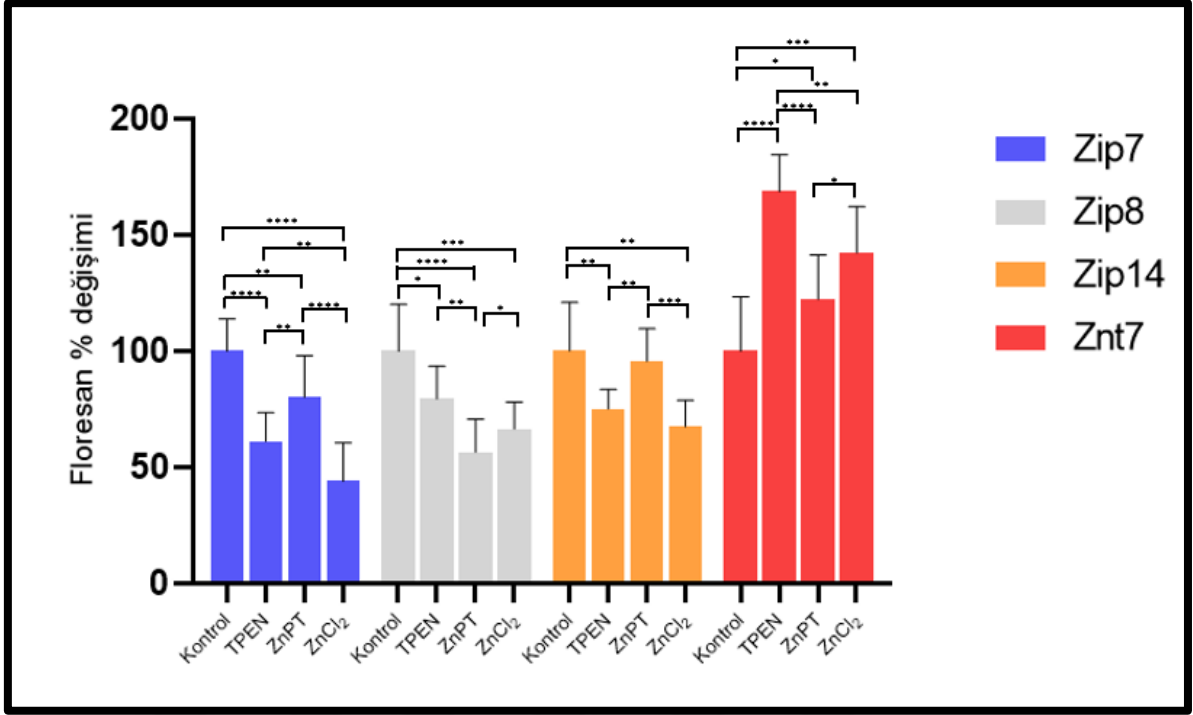
Hem LX2 hem de Hep40 hücrelerinden aldığımız Zip7 sonuçlarında hücre içi Zn²⁺ artışının ardından transkript seviyesinde anlamlı düşüşler gözlemledik. Bu veriler protein seviyelerindeki değişim grafikleri ile desteklenmediği için Zip7 kanalının fonksiyonunda değişiklik olup olmadığına bakıldı. Bunun için fosfo-Zip7 ifadesi iki hücre hattı için de western blot ile incelendi. LX2 hücrelerinde fosfo-Zip7 ifadesinin ZnCl₂ uygulaması yapılan grupta anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir ($p < 0,05^*$) (Şekil 5.7 A). Aynı hücre grubunda TPEN ve ZnPT uygulamalarının ardından Zip7'nin mRNA seviyesinde anlamlı bir düşüş olduğu gösterilmişken, ZnCl₂ uygulanan hücrelerde anlamlı bir azalma kaydedilmemiştir. Hep40 hücrelerinde ise fosfo-Zip7 ifadesinin ZnPT uygulaması yapılan grupta anlamlı biçimde azaldığı görülmektedir ($p < 0,05^*$) (Şekil 5.7 B) ve aynı anlamlı azalma Zip7'nin mRNA ifadesi için de geçerlidir.



Şekil 5.7 LX2 ve Hep40 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn^{2+} 'nin Zip7 kanalının aktif hali olan fosforile formunun protein seviyesindeki etkisinin western blot ile incelenmesi. Normalizasyonlar için GAPDH referans gen olarak kullanılmıştır. Protein seviyesindeki değişiklikler kat değişimi şeklinde hesaplanmıştır. $N=3$, $p<0,05^*$, Ortalama \pm Standart Sapma

5.4.2. İMMÜNOFLORESAN SONUÇLARI

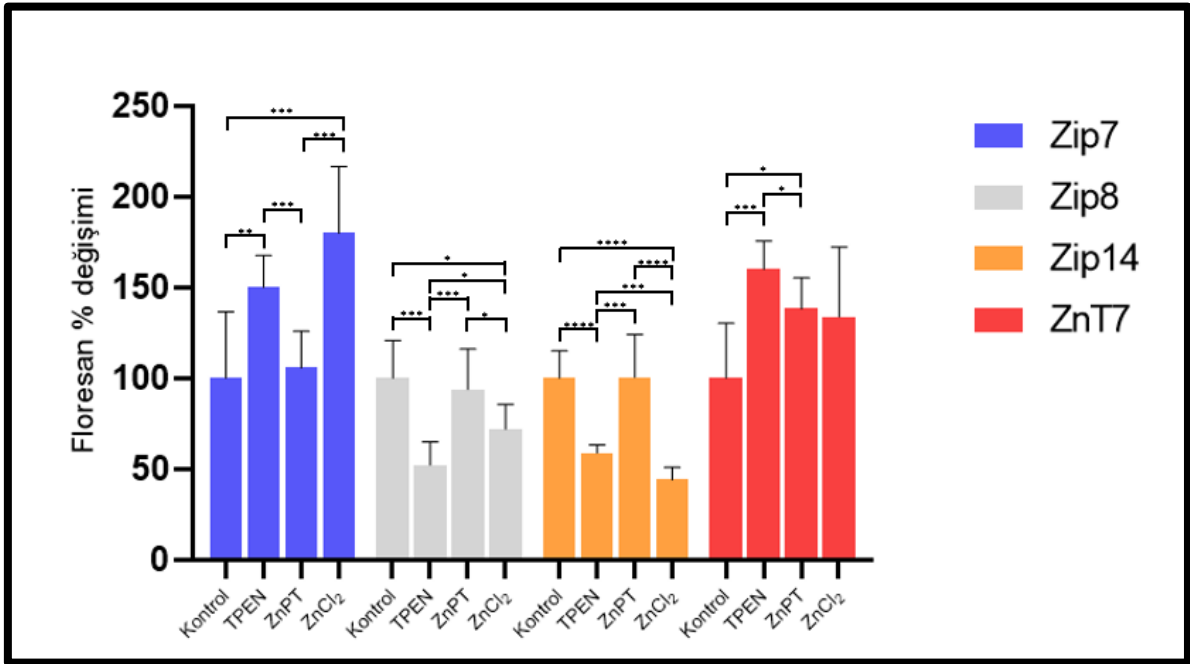
TPEN, ZnPT ve $ZnCl_2$ uygulamasından sonra Zip7, Zip8, Zip14 ve ZnT7 kanal proteinlerinin protein düzeyindeki değişimleri immünofloresan tekniğiyle de incelendi. LX2 hücrelerine yapılan immün boyama sonuçları TPEN uygulaması sonrasında artan hücre içi Zn^{2+} ile Zip7, Zip8 ve zip14 ifadelerinde kontrole göre anlam azalmaların olduğu görülmektedir ($p<0,00001^{****}$, $p<0,05^*$, $p<0,001^{**}$). Üç proteinin grafik eğilimleri oldukça benzerdir. Deney grupları arasında kıyaslamalar yapıldığında Zip7 ve Zip14 ifadelerinin ZnPT uygulaması sonrası TPEN ve $ZnCl_2$ uygulamalarından sonraki ifadelerine kıyasla anlamlı biçimde daha fazla olduğu görülmektedir ($p<0,01^{**}$, $p<0,0001^{****}$, $p<0,01^{**}$, $p<0,05^*$). Kontrol ve ZnPT uygulaması yapılan gruplarda Zip14 ifadesi birbirine yakın çıkmıştır. ZnT7 ifadesinde artan hücre içi çinkoyla birlikte kontrole kıyasla anlamlı artışlar kaydedilmiştir ($p<0,0001^{****}$). TPEN-ZnPT ve TPEN- $ZnCl_2$ grupları kıyaslandığında TPEN uygulaması gören hücre gruplarında ZnT7 ifadesi anlamlı biçimde daha yüksektir ($p<0,0001^{****}$, $p<0,01^{**}$). $ZnCl_2$ uygulanan hücrelerde ise ZnPT uygulananlara kıyasla ZnT7 ifadesi anlamlı biçimde daha fazladır ($p<0,05^*$) (Şekil 5.8).



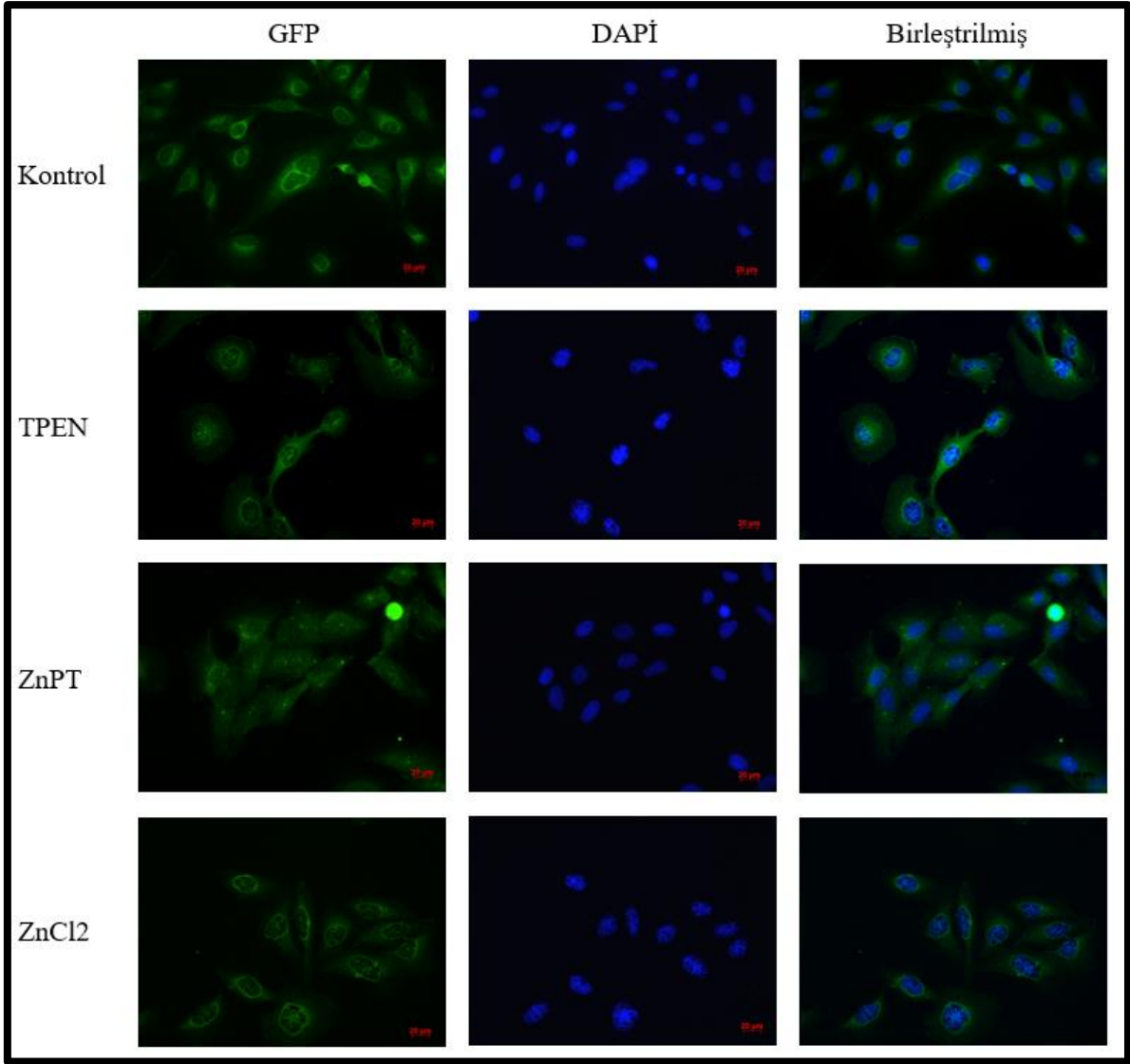
Şekil 5.8 LX2 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn²⁺'nin Zip (A-B) ve ZnT (C) çinko kanal proteinlerinin protein seviyesindeki etkisinin immünofloresan tekniği ile incelenmesi. Zip7 n=12, Zip8 n=9, Zip14 n=8, Zn.t7 n=9, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$, Ortalama \pm Standart Sapma

Hep40 hücrelerinde yapılan immün boyamalarda Zip7 ifadesinin hücre içi Zn²⁺ miktarının artışıyla beraber anlamlı biçimde arttığı görülmektedir ($p<0,01^{**}$). Yalnızca kontrole kıyaslandığında ZnPT uygulanan hücrelerdeki Zip7 artışı anlamlı değildir. ZnPT uygulanan gruptaki Zip7 ifadesi TPEN ve ZnCl₂ uygulanan gruplardan anlamlı biçimde azdır ($p<0,001^{***}$). Bu sonuçlar intrasellüler serbest Zn²⁺ ile Zip7 ifadesi arasında pozitif bir korelasyon olabileceği yönünde yorumlanabilir. Zip8 ve Zip14 kanal proteinlerinin ifadelerinde ise hücre içi çinkonun arttığı gruplarda anlamlı azalmalar olduğu görülmektedir. TPEN ve ZnCl₂ uygulamalarının yapıldığı hücrelerde Zip8 ve Zip14 floresan yüzdeleri kontrole göre anlamlı biçimde azalmıştır ($p<0,001^{***}$, $p<0,05^*$, $p<0,0001^{****}$, $p<0,0001^{****}$). ZnPT uygulanan hücrelerde Zip14 ve Zip8 ifadelerinde kontrole kıyasla anlamlı değişimler yoktur. Zip14 ve Zip8 ifadelerinin ZnPT uygulanan gruplarda TPEN ve ZnCl₂ uygulananlardan anlamlı biçimde daha fazla olduğu görülmektedir. ZnT7 ifadesinin TPEN ve ZnPT uygulamalarından sonra artan hücre içi çinkoya paralel olarak anlamlı biçimde arttığı görülmektedir ($p<0,001^{***}$, $p<0,05^*$). TPEN ve ZnPT arasındaki ifade farkı

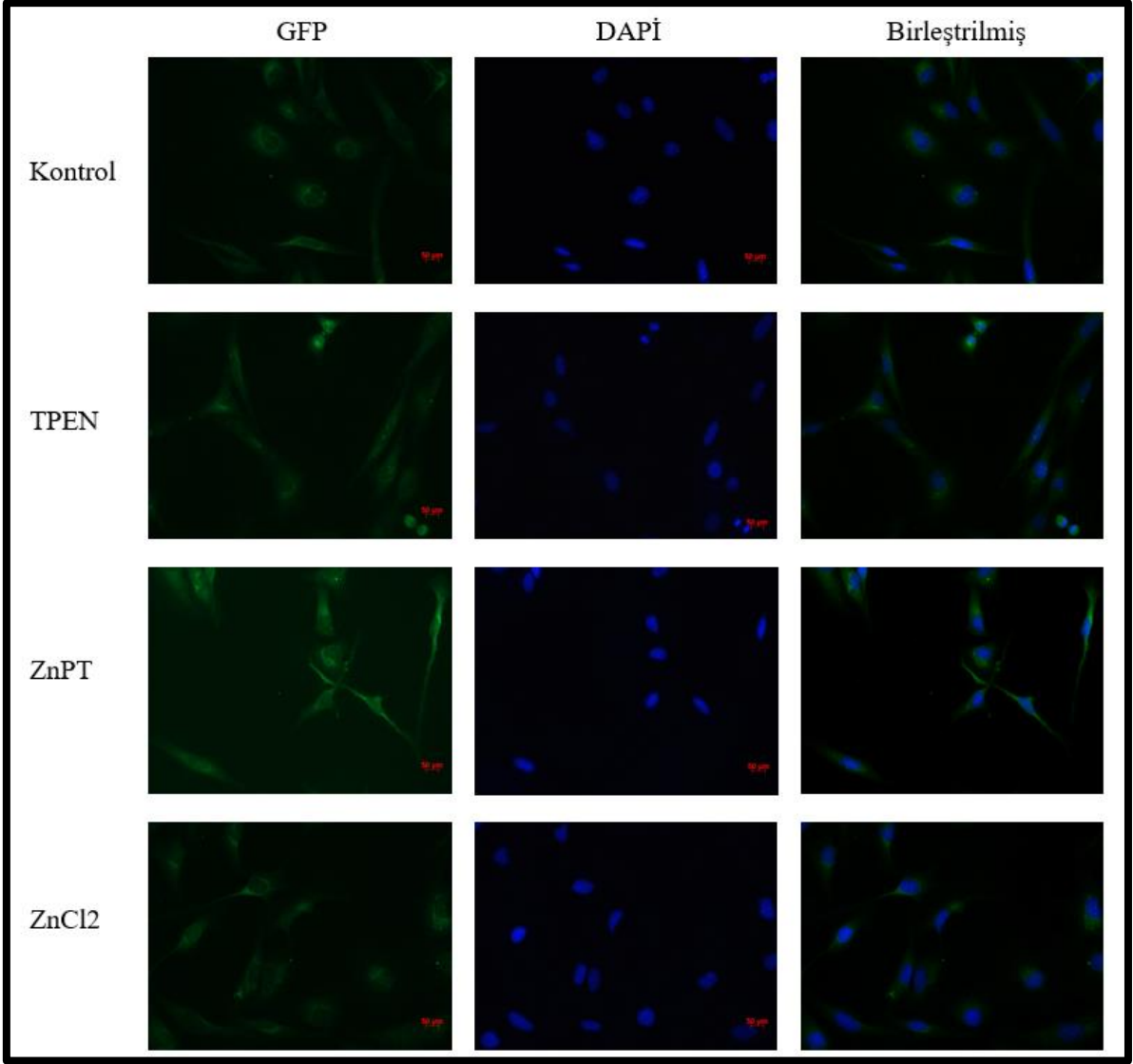
da istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Ancak $ZnCl_2$ uygulamasından sonra ZnT7 ifadesinde yaşanan değişim diğer grupların hiçbirine göre anlamlı çıkmamıştır. (Şekil 5.9).



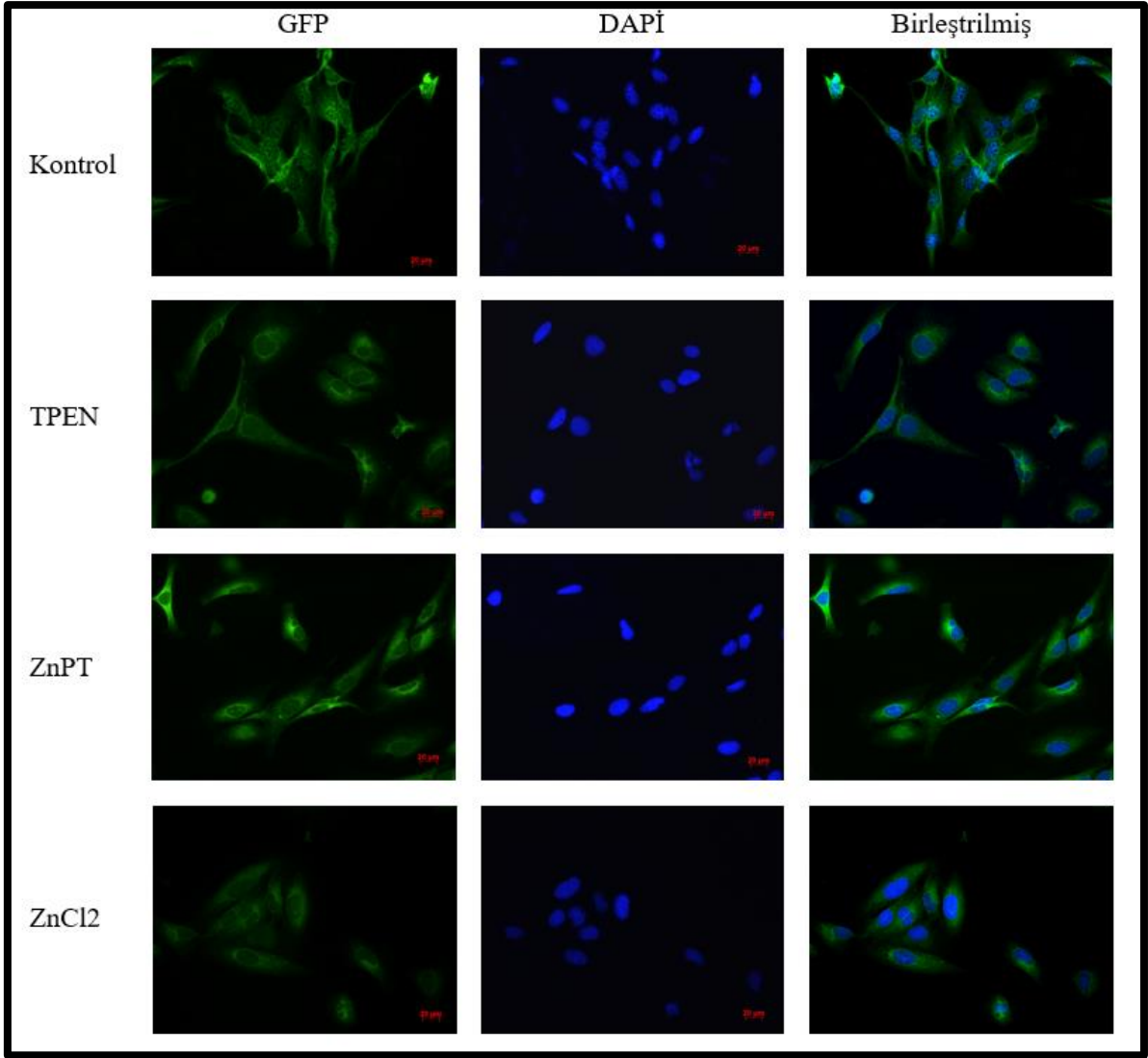
Şekil 5.9 Hep40 hücrelerinde, farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn^{2+} 'nin Zip (A-B) ve ZnT (C) çinko kanal proteinlerinin protein seviyesindeki etkisinin immüno Floresan tekniği ile incelenmesi. Zip7 n=8, Zip8 n=7, Zip14 n=8, Zn.t7 n=7, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, Ortalama \pm Standart Sapma



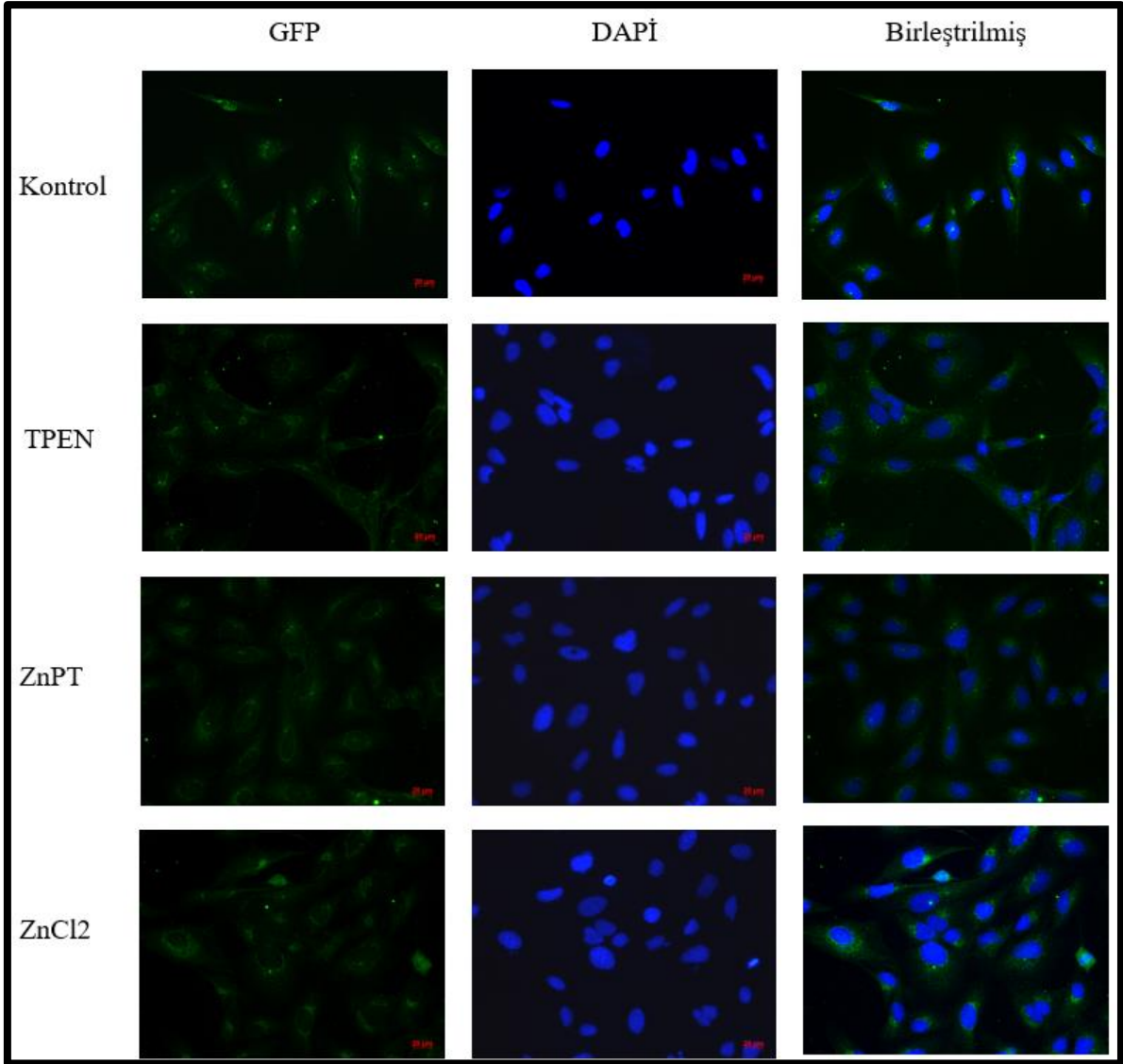
şekil 5.10 LX2 hücreslerinde Zip7 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).



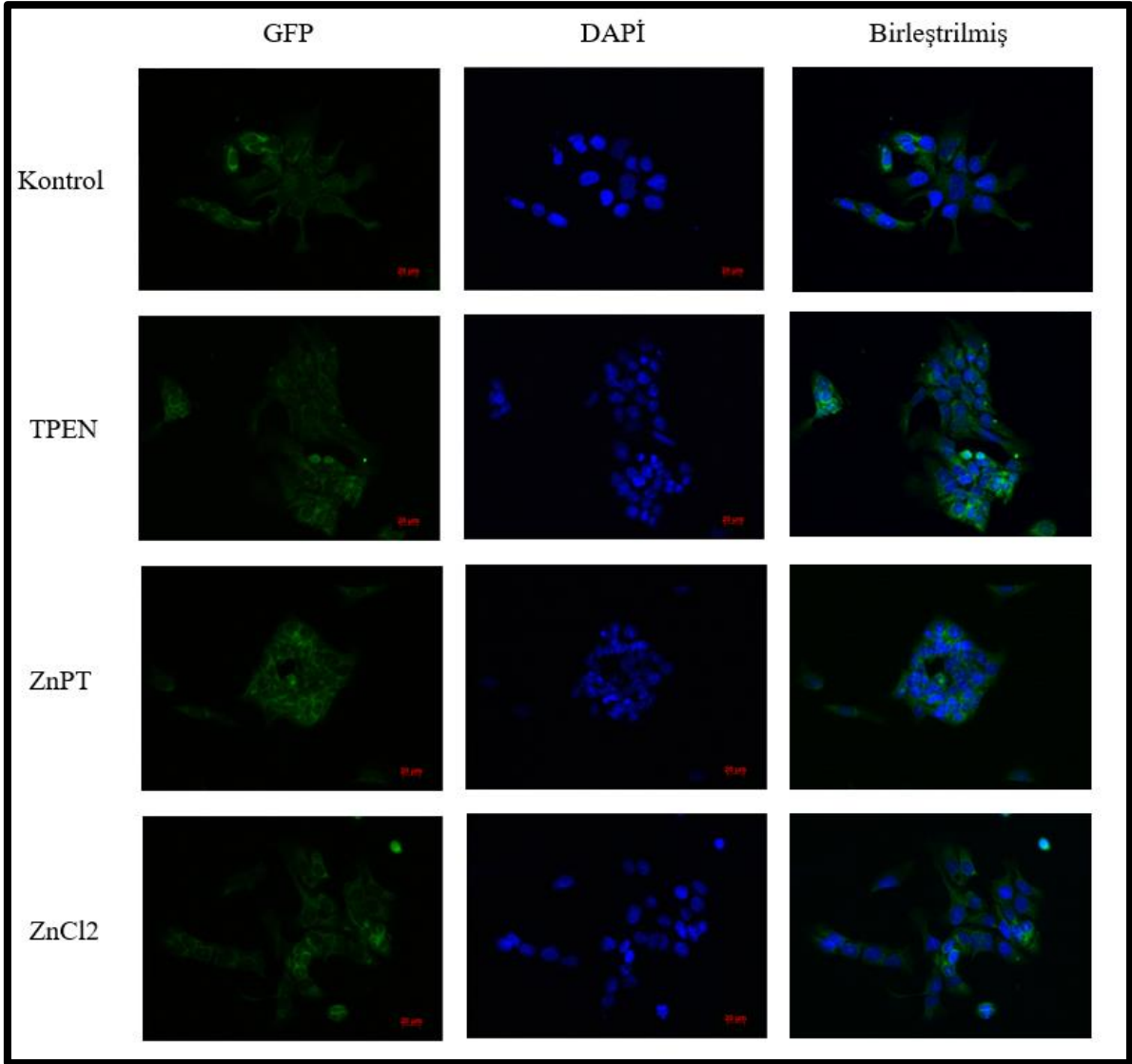
şekil 5.11 LX2 hücreslerinde Zip8 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).



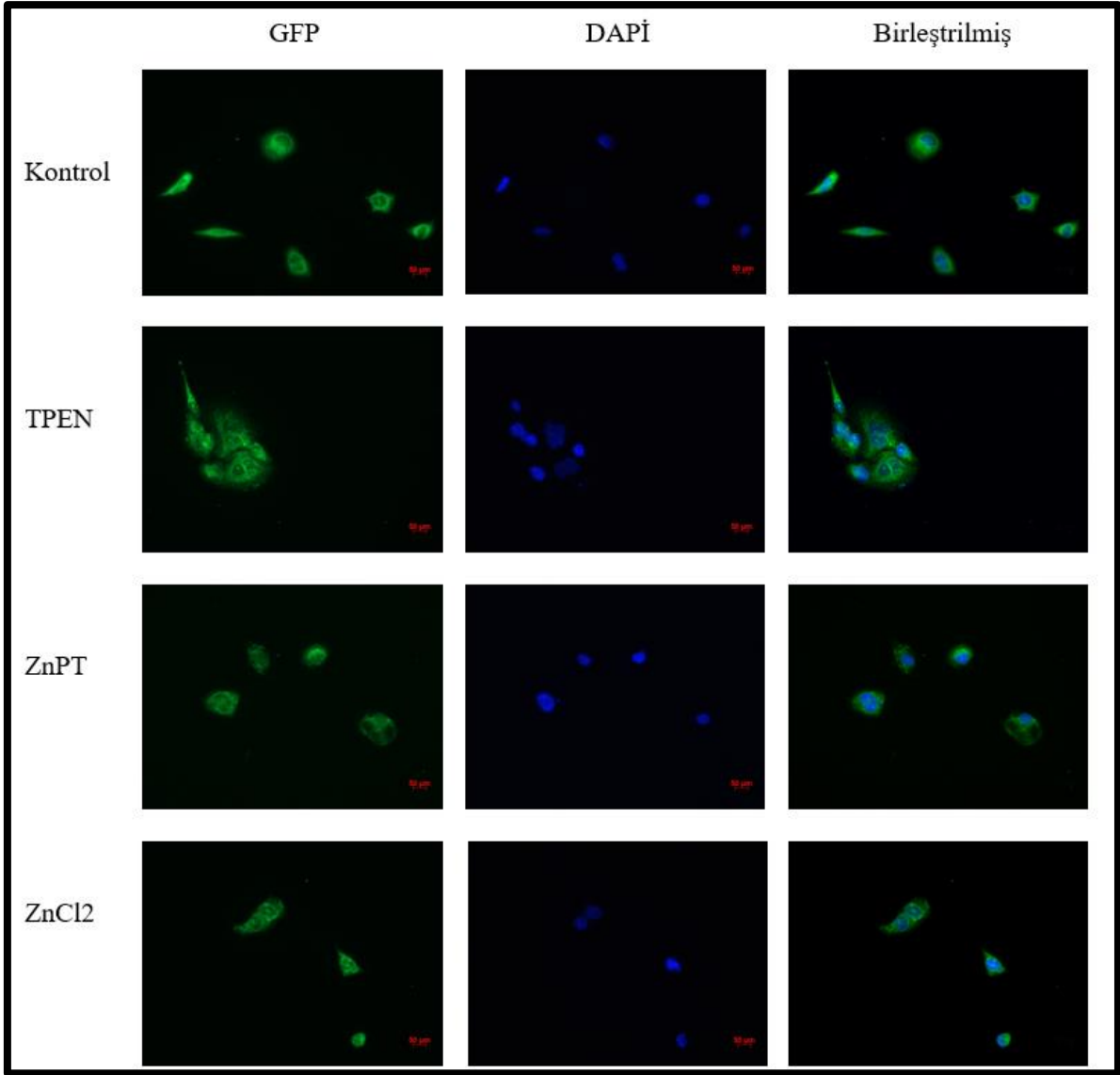
şekil 5.12 LX2 hücresinde Zip14 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).



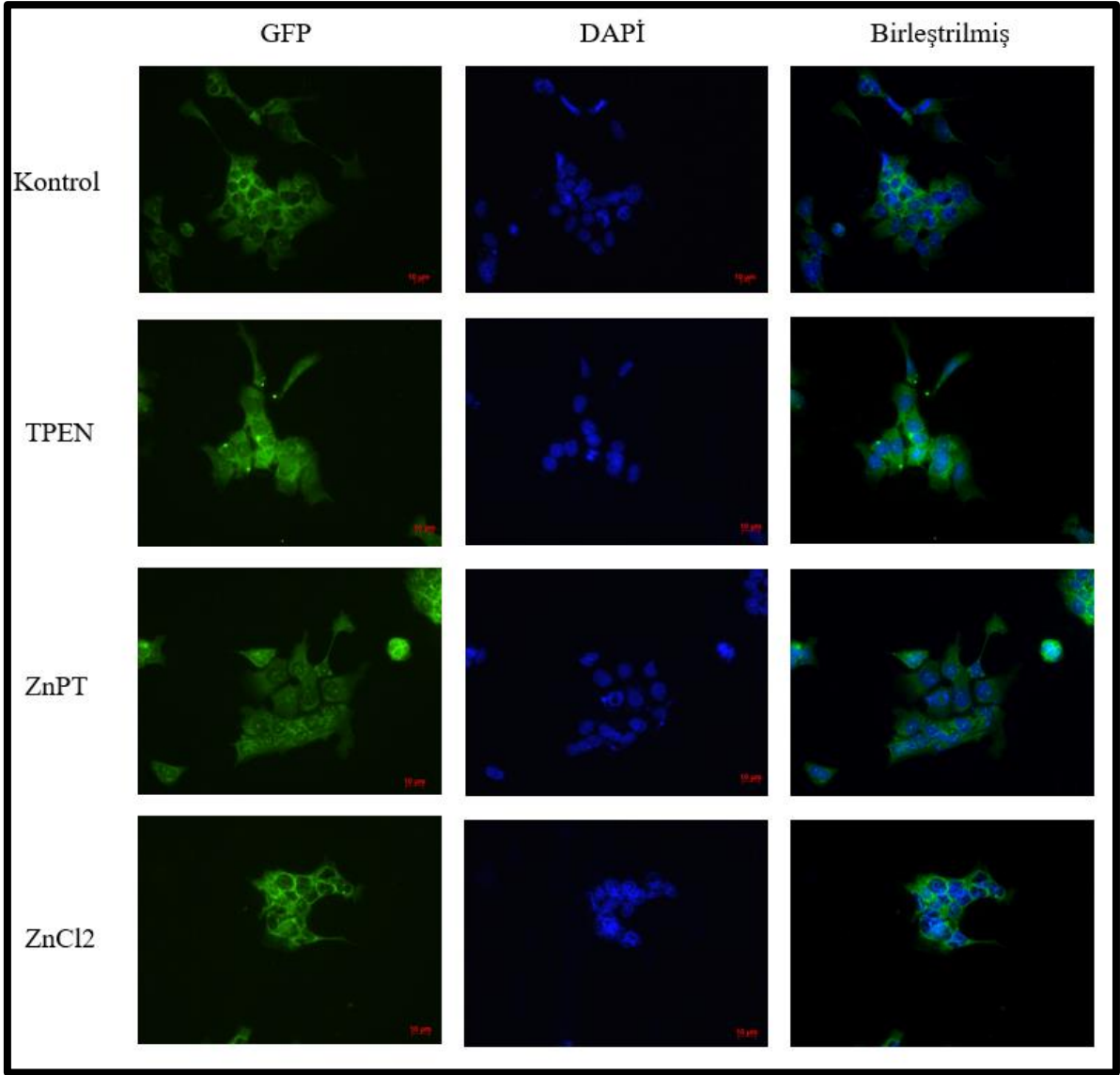
şekil 5.13 LX2 hücreslerinde ZnT7 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).



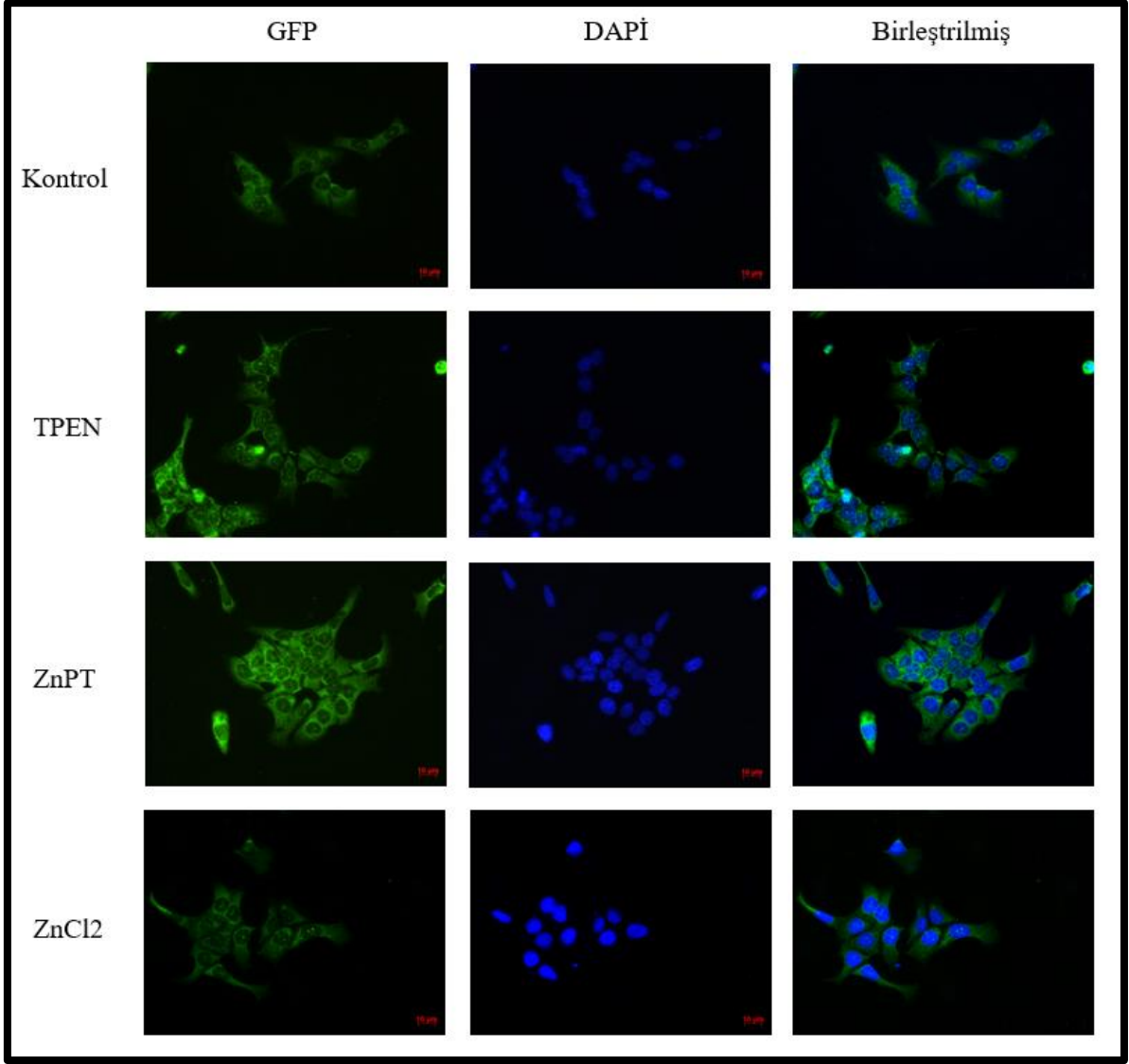
şekil 5.14 Hep40 hücreslerinde Zip7 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).



şekil 5.15 Hep40 hücresinde Zip8 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).



şekil 5.16 Hep40 hücresinde Zip14 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).



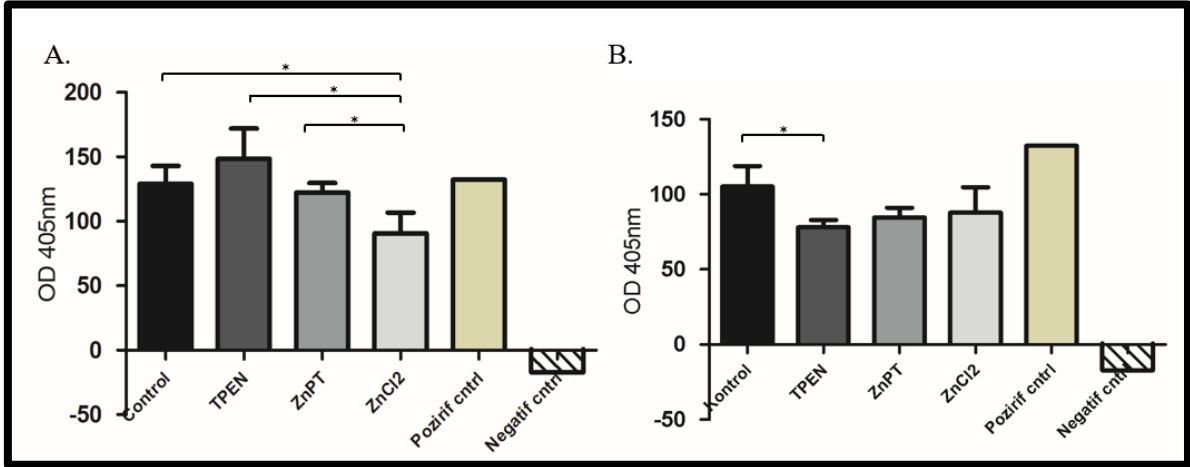
şekil 5.17 Hep40 hücrelerinde ZnT7 immünofloresan boyama görüntüleri (40X).

5.5. TOTAL HDAC AKTİVİTESİ ÖLÇÜM SONUÇLARI

TPEN, ZnPT ve ZnCl₂ uygulamaları sonrası hücre içi Zn²⁺ konsantrasyonunda meydana gelen anlamlı artışın çinko parmak motifi bulunduran HDAC proteinlerinin aktivitesi üzerindeki etkisi kolorimetrik HDAC aktivite kitiyle (Biovision, K331) incelendi.

LX2 hücrelerinde ZnCl₂ uygulamasının ardından HDAC aktivitesinin anlamlı biçimde azaldığı görülmektedir. Her ne kadar TPEN uygulamasının ardından grafik üzerinde artış görünse de bu artış anlamlı değildir. Fakat TPEN-ZnCl₂ kıyaslaması yapıldığında TPEN uygulaması görmüş hücrelerin ZnCl₂ uygulaması yapılmış hücrelerden anlamlı biçimde

daha fazla HDAC aktivitesine sahip oldukları görülmektedir ($p<0,05^*$). Aynı kıyaslama ZnPT ve ZnCl₂ grupları arasında yapıldığında da ZnPT grubunun anlamlı biçimde daha fazla HDAC aktivitesine sahip olduğu görülmektedir ($p<0,05^*$) (Şekil 5.16 A). Hep40 hücrelerinde yalnızca TPEN uygulamasının ardından HDAC aktivitesinde anlamlı bir düşüş vardır ($p<0,05^*$). (Şekil 5.16 B) İki hücre hattından da aldığımız sonuçlar hücre içi serbest Zn²⁺ konsantrasyonu ile tam bir paralellik göstermemektedir.

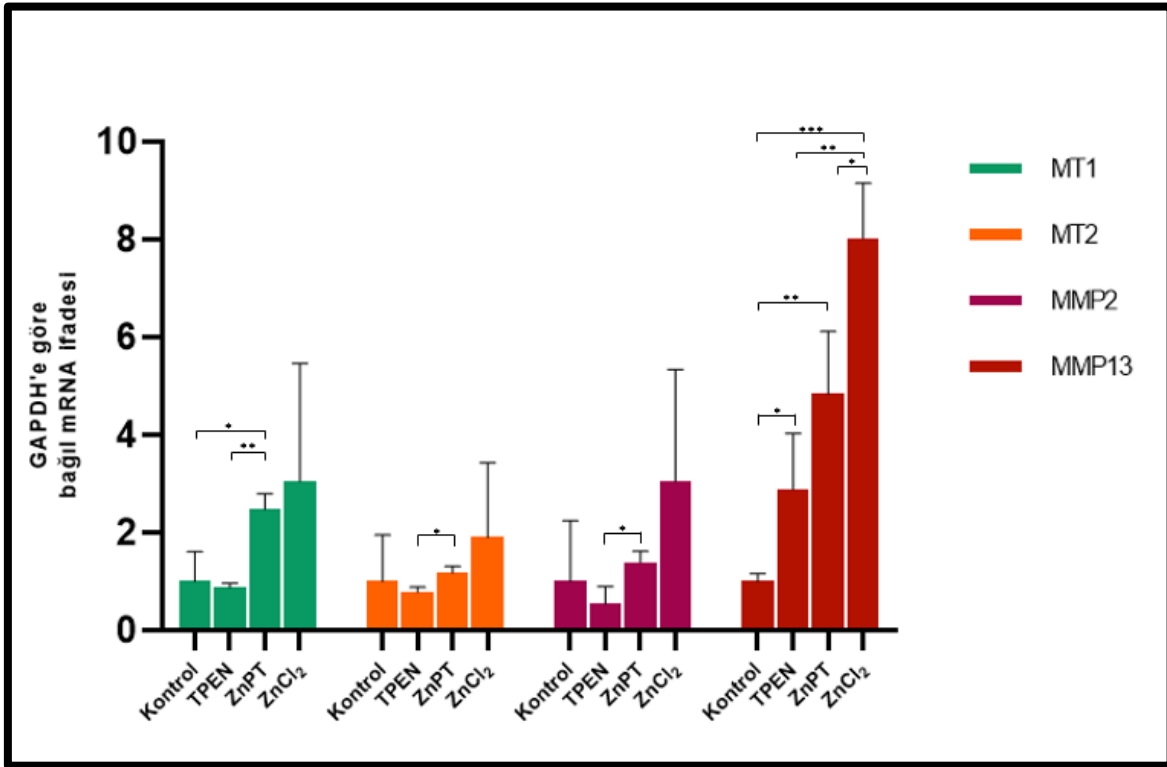


Şekil 5.18 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerindeki total HDAC aktivitesinin farklı seviyelerdeki hücre içi serbest Zn²⁺ karşısındaki değişimi, $p<0,05^*$

5.6. MMP2, MMP13, MT1 VE MT2 GENLERİNİN İFADESİNİN TRANSKRİPT DÜZEYİNDE İNCELENMESİ VE HDAC4'ÜN BAĞLANMA PROFİLİNİN KROMATİN İMMÜNOPRESİPİTASYON İLE İNCELENMESİ

HDAC4'ün metalloprotein (MT1-2) ve matriks metalloproteinlerine (MMP2-13) bağlanma profili, hücre içi Zn²⁺'nin fibroz statüsü üzerindeki epigenetik etkisinin anlaşılması açısından önem taşımaktadır. Ancak HDAC4'ün bu genler üzerindeki etkisinin sonuçlarını değerlendirebilmek için bu genlerin uygulamalardan sonraki mRNA seviyelerini qRT-PZR ile inceledik. LX2 hücrelerine yapılan hücre içi çinko seviyesini arttıran uygulamalardan sonra MT1, MT2 ve MMP2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişim oldukça benzerlik göstermektedir. Üç gende de TPEN uygulamasının ardından kontrole göre düşüş olduğu görülse de bu düşüş üçünde de istatistiksel olarak anlamlı değildir. ZnPT uygulamasıyla artan mRNA seviyeleri MT2 ve MMP2 genlerinde kontrole göre anlamlı değildir, ancak MT1 genindeki bu artışın anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0,05^*$). MMP13 geninde ise üç uygulamanın da ardından mRNA seviyesi anlamlı biçimde artmıştır ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$). MMP13 ifadesini artırma da en etkili uygulama ZnCl₂ uygulamasıdır; ZnCl₂

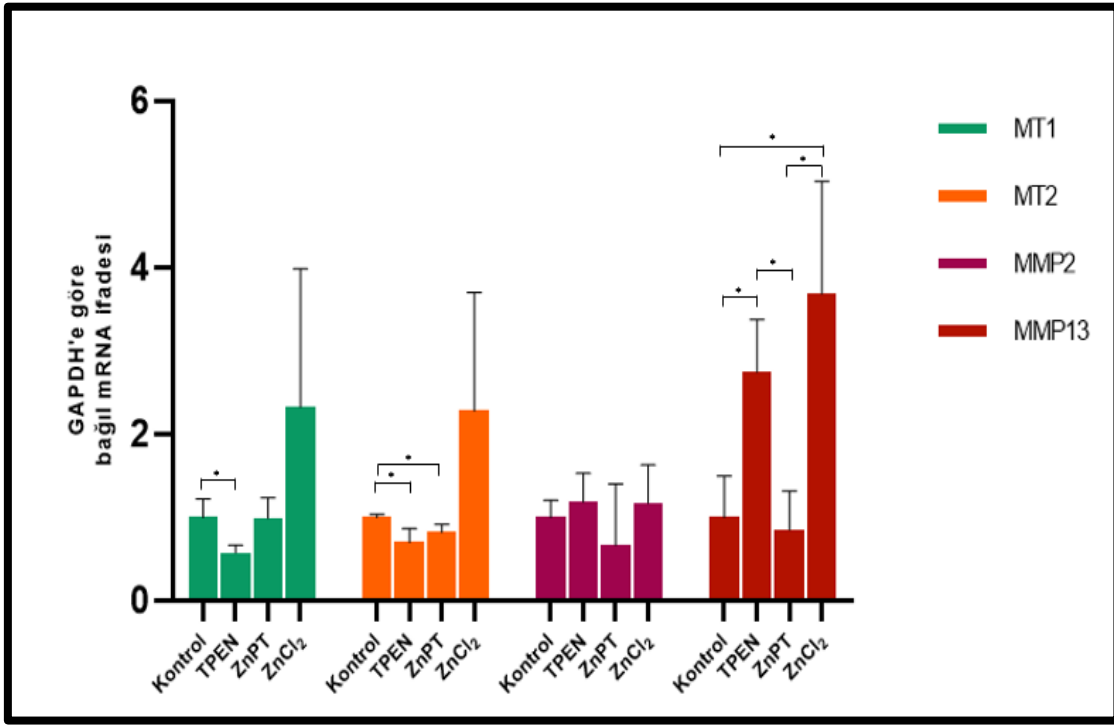
grubundaki ifade artışı hem TPEN hem de ZnPT uygulanan gruplardaki değişimlerden anlamlı biçimde fazladır ($p<0,01^{**}$, $p<0,05^{*}$) (Şekil 15.7).



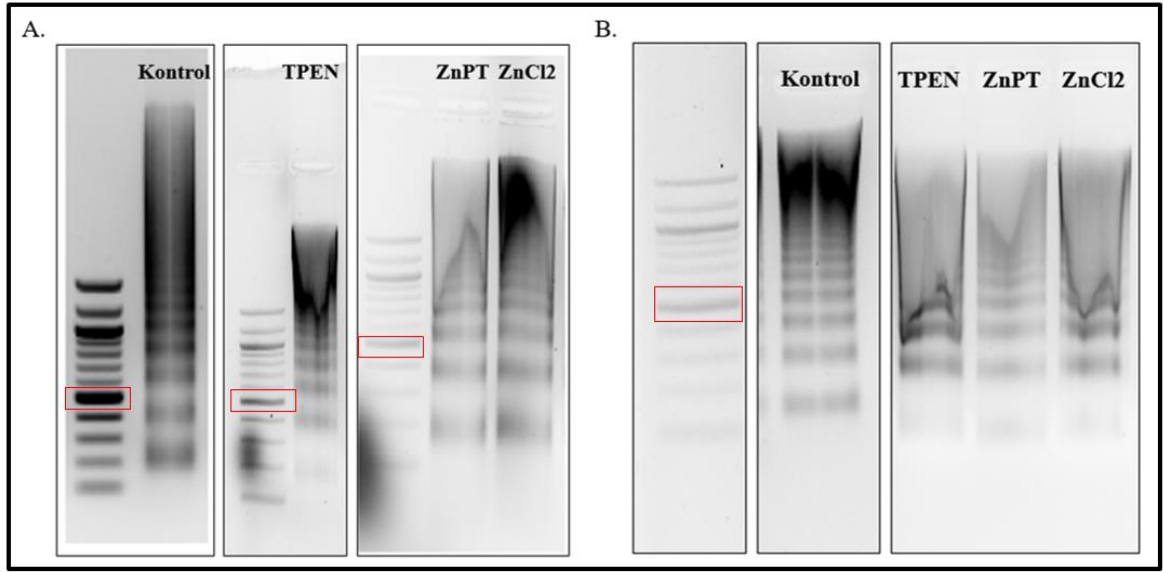
Şekil 5.19 LX2 hücrelerinin MT1, MT2, MMP2 ve MMP13 gen ifadelerinin TPEN, ZnPT ve ZnCl₂ uygulamalarından sonraki transkript seviyesindeki değişimlerinin qRT-PZR sonuçları. N=3, $p<0,05^{*}$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma

Hep40 hücrelerine yapılan hücre içi çinko seviyesini arttıran uygulamalardan sonra MT1, MT2 ve MMP2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişim incelendiğinde dört gendeki değişimlerin bazıları ortaklık göstermektedir. ZnPT uygulamasının ardından dört genin mRNA seviyesinde düşüş görülmektedir ancak bu düşüş yalnızca MT2 geninde kontrole göre anlamlıdır. ZnCl₂ uygulamasından sonra dört gende de mRNA seviyesi artış göstermektedir ancak yalnızca MMP13 genindeki artış kontrole göre anlamlı olmuştur ($p<0,05^{*}$). MT1 ve MT2 genlerinde TPEN uygulamasının ardından kontrole göre anlamlı bir azalma görülmektedir ($p<0,05^{*}$). MMP13 geninde TPEN uygulamasından sonra anlamlı bir ifade artışı bulunmaktadır benzer bir durum MMP2 geninde de görülse de MMP2'deki artış kontrole göre anlamlı değildir. MMP2 ve MMP13 genlerinin ifadesinde TPEN ve ZnPT uygulamaları kıyaslandığı zaman ZnPT uygulamasının ardından azalma olduğu görülmektedir, ancak bu azalma yalnızca MMP13 geninde anlamlı olmuştur ($p<0,05^{*}$).

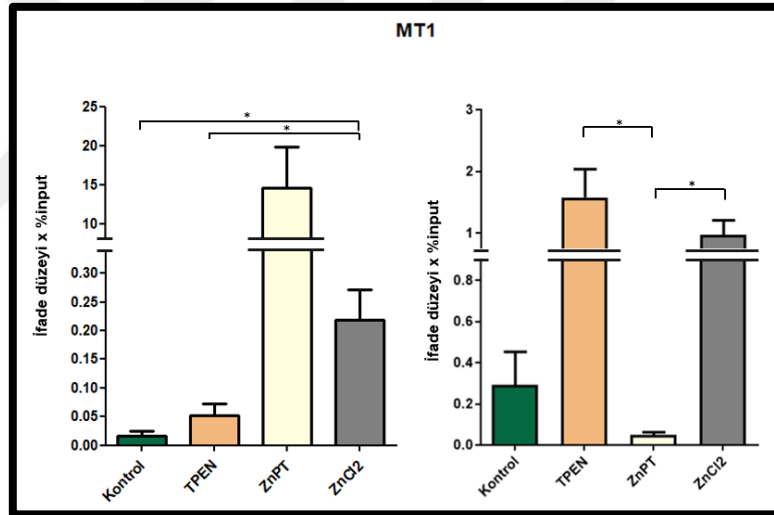
HDAC4'ün MT1, MT2, MMP2 ve MMP13 genlerine bağlanmasını incelemek için kromatin immünopresipitasyonu yaptık. LX2 ve Hep40 hücrelerine TPEN, ZnPT ve ZnCl₂ uygulaması yapıldıktan sonra hücre grupları ChIP protokolüne uygun olarak işleme tabi tutulmuştur. Önce mikrokokal nükleaz ile inkübe edilmiş daha sonra da sonikasyon yapılarak çift sarmal genomik DNA'ları yaklaşık 150-900 baz çifti olacak şekilde parçalanmıştır. Bu parçalanmanın kontrolü ise proteinaz K ile inkübasyon sonrasında agaroz jel elektroforezi ile teyit edilmiştir (Şekil 5.19).



Şekil 5.20 Hep40 hücrelerinin MT1, MT2, MMP2 ve MMP13 gen ifadelerinin TPEN, ZnPT ve ZnCl₂ uygulamalarından sonraki transkript seviyesindeki değişimlerinin qRT-PZR sonuçları. $N=3$, $p<0,05$ *, $p<0,01$ **, $p<0,001$ ***; Ortalama \pm Standart Sapma



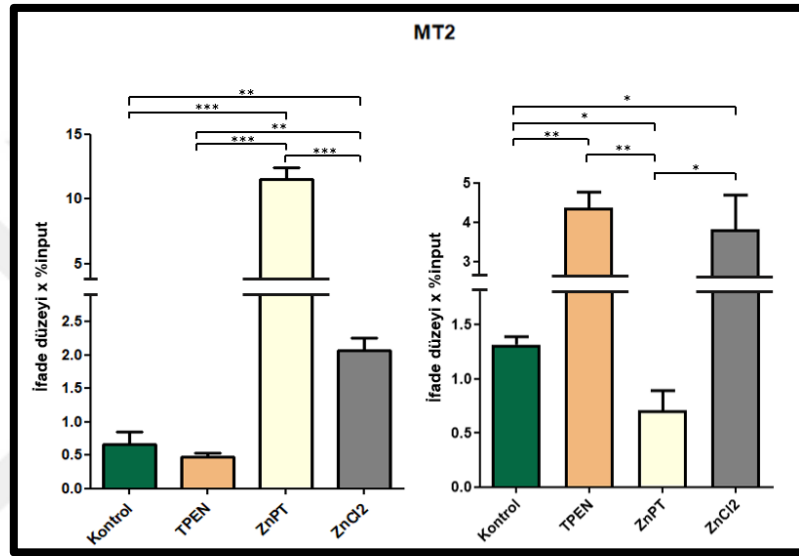
Şekil 5.21 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerinin kromatik kırma işlemi sonrasında validasyon jel görüntüleri, kırmızı kutucuk DNA cetvelinde 500 baz çifti hizasını göstermektedir



Şekil 5.22 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerinde HDAC4'ün MT1 genine bağlanma yüzdesinin kromatin immünopresipitasyonu ile incelenmesi. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma

HDAC4'ün MT1 genine bağlanma yüzdesi LX2 hücrelerinde kontrolle kıyaslandığında yalnızca ZnCl₂ uygulaması sonrasında artarken Hep40 hücrelerinde kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir artma ya da azalma görülmemektedir ($p<0,05^*$). Ancak Hep40 hücrelerinde TPEN uygulanan grup kontrolle kıyaslandığında elde edilen p-değeri 0,056'dır, $p<0,05^*$ oranına oldukça yakındır. Buna benzer bir durum LX2 hücrelerinde ZnPT uygulaması yapılan grup içinde geçerlidir. ZnPT uygulaması yapılan LX2 hücreleri kontrol

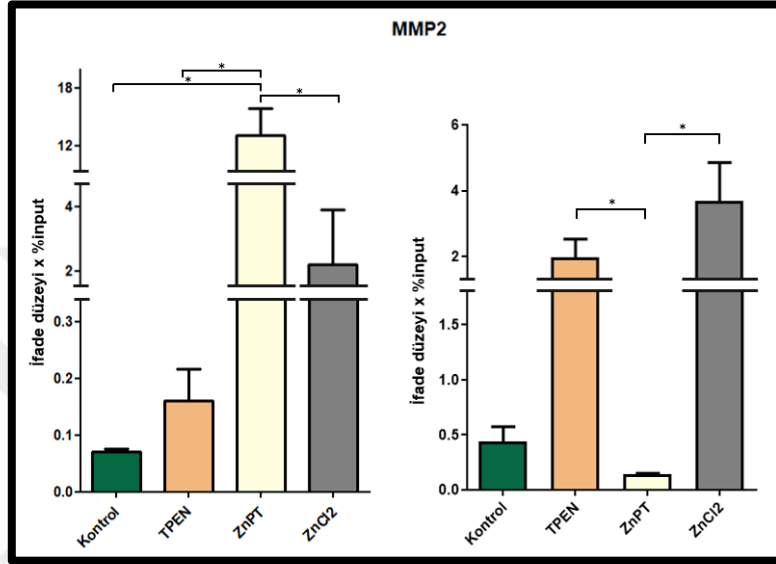
grubuyla kıyaslandığında p-değeri 0,053'tür yani anlamlı bir artış olarak değerlendirilme sınırına oldukça yakındır. LX2 hücrelerinde TPEN-ZnCl₂ grupları kıyaslandığında ZnCl₂ uygulaması yapılan hücrelerde HDAC4'ün MT1 genine bağlanma yüzdesinde anlamlı bir artış görülmektedir (p<0,05*). Hep40 hücrelerinde TPEN-ZnPT grupları kıyaslandığında TPEN uygulaması yapılan grupta HDAC4 bağlanma yüzdesi anlamlı biçimde daha fazladır (p<0,05*). ZnPT-ZnCl₂ grupları kıyaslandığında ZnCl₂ uygulaması gören hücrelerde HDAC4 bağlanma yüzdesinin ZnPT uygulanan hücrelerden anlamlı biçimde daha fazla olduğu görülmektedir (p<0,05*) (Şekil 15.8).



Şekil 5.23 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerinde HDAC4'ün MT2 genine bağlanma yüzdesinin kromatin immünopresipitasyonu ile incelenmesi. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma

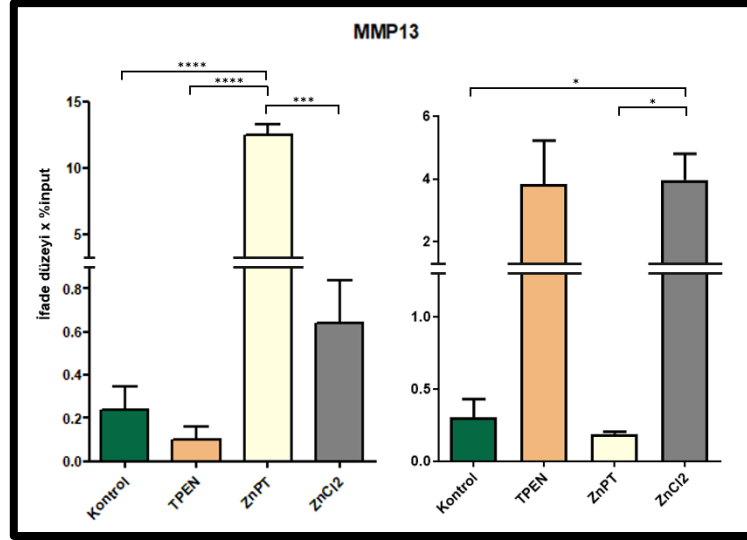
Yapılan ChIP deneyinin en anlamlı sonuçları HDAC4'ün MT2 genine bağlanma yüzdesi incelendiğinde görülmektedir. LX2 hücrelerinde kontrole kıyaslandığında ZnPT ve ZnCl₂ uygulanan hücrelerde HDAC4'ün bağlanma yüzdesinde anlamlı bir artış görülmektedir ($p<0,001^{***}$, $p<0,001^{**}$). Hep40 hücrelerinde ise kontrole kıyaslandığında TPEN ve ZnCl₂ uygulaması yapılan gruplarda anlamlı artışlar görülürken ZnPT uygulaması yapılan hücrelerde HDAC4'ün MT2 genine bağlanma yüzdesi anlamlı biçimde azalmaktadır ($p<0,01^{**}$, $p<0,05^*$, $p<0,05^*$). Deney grupları arasında yapılan kıyaslarda ise LX2 hücrelerinde hem ZnPT hem de ZnCl₂ uygulanan hücrelerdeki HDAC4 bağlanma yüzdesi TPEN uygulaması gören hücrelerden anlamlı biçimde fazladır ($p<0,001^{***}$, $p<0,01^{**}$). ZnPT ve ZnCl₂ grupları kıyaslandığında ZnPT uygulanan grupta HDAC4'ün MT2 genine bağlanma yüzdesi ZnCl₂ uygulanan gruba göre anlamlı biçimde daha fazladır ($p<0,001^{***}$).

Hep40 hücrelerinde ise bu durumun tam tersi görülmektedir. ZnCl₂ uygulaması yapılmış hücrelerde HDAC4 bağlanma yüzdesi ZnPT uygulanan hücelere kıyasla anlamlı biçimde daha fazladır ($p < 0,05^*$). Hep40 hücrelerinin TPEN-ZnPT grupları kıyaslandığında LX2 hücrelerinde görülen durumun tam tersi görülmektedir. TPEN uygulaması gören hücrelerde HDAC4'ün MT2 genine bağlanma yüzdesi ZnPT uygulanan hücrelerden anlamlı biçimde daha fazladır ($p < 0,01^{**}$) (Şekil 15.21).



Şekil 5.24 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerinde HDAC4'ün MMP2 genine bağlanma yüzdesinin kromatin immünopresipitasyonu ile incelenmesi. $N=3$, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma

HDAC4'ün MMP2 genine bağlanma yüzdeleri incelendiğinde kontrole kıyasla yalnızca LX2 hücrelerinde ZnPT uygulanan grupta anlamlı bir artış görülmektedir ($p < 0,05^*$). Ancak Hep40 hücrelerinde TPEN uygulaması yapılan hücreler kontrol grubuyla kıyaslandığında elde edilen p-değeri 0,055'tir, yani uygulama sonrası yaşanan artış anlamlı olarak değerlendirme sınırına oldukça yakındır. LX2 hücrelerinde deney grupları arasında kıyaslama yapıldığında ZnPT uygulanan gruptaki HDAC4'ün bağlanma oranı hem TPEN hem de ZnCl₂ uygulanan gruplara kıyasla anlamlı biçimde fazladır ($p < 0,05^*$). Hep40 hücrelerinde ise bu durumun tam tersi görülmektedir. TPEN ve ZnCl₂ uygulanan hücrelerde ZnPT uygulananlara kıyasla HDAC4 daha yüksek oranda MMP2'ye bağlanmaktadır ($p < 0,05^*$) (Şekil 15.22).



Şekil 5.25 LX2 (A) ve Hep40 (B) hücrelerinde HDAC4'ün MMP2 genine bağlanma yüzdesinin kromatin immünopresipitasyonu ile incelenmesi. $N=3$, $p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$; Ortalama \pm Standart Sapma

HDAC4'ün MMP13 genine bağlanma yüzdesinin LX2 ve Hep40 hücrelerinin kontrol gruplarında birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. LX2 hücrelerinde ZnPT uygulanan grupta HDAC4'ün bağlanma yüzdesi kontrole kıyasla anlamlı biçimde artmaktadır ($p<0,0001^{****}$). Hep40 hücrelerinde ise kontrole göre anlamlı bir artış yalnızca ZnCl2 uygulanan hücrelerde görülmektedir ($p<0,05^*$). Ancak TPEN uygulaması yapılan Hep40 hücreleri kontrol grubuyla kıyaslandığında elde edilen p-değeri 0,06'dır yani anlamlı olarak değerlendirilmeye yakın olarak değerlendirilebilir. LX2 hücrelerinde TPEN ve ZnPT uygulanan gruplar kıyaslandığında ZnPT uygulanan hücrelerde HDAC4'ün bağlanma yüzdesinin anlamlı biçimde arttığı görülmektedir ($p<0,0001^{****}$, $p<0,001^{***}$). Hep40 hücreleri için bu durumun tam tersi geçerli gibi görünmektedir ancak azalma anlamlı sayılma sınırına oldukça yakındır, p-değeri 0,0579'dur (Şekil 15.23).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Yaptığımız bu tez çalışmasında çinkonun anti-fibrotik etkisi ve hepatoma kanser hücreleri üzerindeki etkisinin genetik ve epigenetik mekanizması incelenmiştir. Fibrotik hücre modeli olarak LX2, hepatoma hücre modeli olarak Hep40 kullanılmıştır. LX2 hücreleri insan erkek karaciğerinden izole edilen HSH hücrelerinden orijin almaktadır. Primer kültürdeki hücreler düşük serum seviyesinde spontane olarak immortalize edilerek oturtulmuş bir hücre hattıdır (101). LX2 hücrelerinde aktif HSH'lerin karakteristik özellikleri olan Alfa-SMA, vimentin, GFAB ve PDGFR-beta ifadeleri bulunmaktadır. Ayrıca LX2 hücreleri aktif HSH'ler gibi pro-kollajen, pro-MMP2, MMP14 ve TIMP-1/2 salgılamaktadırlar (102,103). Hep40 hücre hattı ise HBsAg+ ve anti-HB insan erkek karaciğerinden izole edilen HCC hücrelerinin primer kültürde çoğaltılmasıyla oluşturulmuştur (104). Hepatit B virüsü ile enjekte hastalarda hepatosit hasarı ve tamiri sürecine bağlı karaciğer fibrozu oluşumu görülmektedir. Ek olarak, HBV X proteininin fibrojenik ve kanserojenik etkisi olduğu LX2 hücrelerinin model olarak kullanıldığı bir çalışmada gösterilmiştir (105). HBV enfeksiyonu kaynaklı karaciğer fibrozunun siroza ve HCC'ye ilerlemesi sırasında karaciğer dokusunda görülen değişiklikler ile farklı orijinli fibrotik dokudan başlayan prognoz ile aynıdır (106). Bu sebeplerden dolayı Hep40 hücrelerinin HBV enfekte hücreler olmasının fibroz sonrası gelişen hepatoma hücre modeli olarak kullanılması uygun görülmüştür.

Çalışmamızda çinko şelatörü TPEN'in uygulaması hücrelerde ciddi anlamda çinko artışına sebep olmuştur. TPEN uygulaması sonrasında yaşanan çinko artışı, hücre içi çinkoyu arttırmaya yönelik uyguladığımız ZnPT ve ZnCl₂'den çok daha fazladır. Hücrelerin TPEN uygulamasına verdiği yanıtın, ani çinko eksikliğine bağlı oluşan oksidatif stresten kaynaklandığı düşünülmektedir. 2017 yılında yapılan bir çalışmada, fare böbrek epitel hücrelerine 24 saat boyunca 1 nM TPEN uygulanarak hücrel çinko eksikliği modeli oluşturulmuş ve NADP-oksidad-2 (Nox2) ifadesinin arttığı buna bağlı olarak da hücrelerin oksidatif strese girdikleri gösterilmiştir (107). Ancak NADP-oksidad birikimine yalnızca çinko eksikliğinin değil, fazla çinkonun da sebep olduğu bilinmektedir (108). Uygun miktardaki çinko ise hücre ve organel membranlarının stabilizasyonunu sağlayarak ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidad (NADP-oksidad) enzimini inhibe ederek

hücreleri oksidatif hasardan korumaktadır (109). Bu tez çalışmasında fibrotik ve kanser hücrelerine 18 saat boyunca 100 nM TPEN uygulanmıştır. Hücre içi çinko artışı LX2 hücrelerinde yaklaşık 3,5 kat ve Hep40 hücrelerinde yaklaşık 6,5 kat olmuştur. MT proteinleri hücre oksidatif stres altındayken bağlı tuttuğu Zn^{2+} iyonlarını serbest hale getirerek yanıt vermektedir. Buna bağlı olarak hücre içi Zn^{2+} yoğunluğunun artması ile MTF-1 aktivasyonu artmaktadır. Aktif MTF-1, MT transkripsiyonunu arttırarak sitoplazmada bulunan serbest Zn^{2+} 'nin yoğunluğunun azaltılması sağlanır (110). Bu mekanizma sayesinde hücreler MT proteinleri aracılığıyla oksidatif stresi azaltarak kendilerini korumaya alırlar. 100 nM TPEN uygulamasının ardından görülen hücresel çinko artışının yüksek olmasının sebebi, oksidatif strese bağlı olarak hücrelerin kendilerini korumaya yönelik verdikleri bir yanıt olarak yorumlanabileceği düşünülmektedir. İki hücre hattında da TPEN uygulamasından sonra oluşan oksidatif stres sonrasında ifadelerinin artması beklenen MTF-1, MT1A ve MT2 genlerinin mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüşler yaşanmıştır. Kullanılan tüm dozlara MTT testinin ardından karar verilmişse de bu duruma, uygulanan TPEN dozunun literatürdeki yaygın kullanım dozundan 100 kat daha fazla olmasının hücrelerin verdiği yanıtın şiddetini de etkilediği, buna bağlı olarak çok fazla artan hücresel çinkonun da hücrelerin stres halinin devam etmesine sebep olduğu düşünülmektedir. 18 saatlik uygulamanın başında hücresel çinkonun şelate edilmesinin ardından oluşan oksidatif strese yanıt olarak MT proteinlerinin bağladığı Zn^{2+} iyonlarını serbest bırakması, hücrenin bozulan çinko homeostazisini dengeye yeniden getirme çabası olarak görülmektedir. Bu süreçte çinko-bağımlı transkripsiyon faktörü MTF-1 beklenen şekilde etkilenmemesi uygulanan dozun fazla olmasıyla açıklanabilir. Hücreye ekstrasellüler ortamdan çinko alımını sağlayan Zip14 ve Zip8 kanalları ile endoplazmik retikulum (ER) üzerinde yoğunlaşmış Zip7 kanal proteininin TPEN uygulaması sonrası ifade seviyeleri incelendiğinde genel eğilim ifade azalması yönündedir. Fibrotik hücrelerde üç kanalın hem mRNA seviyesinde hem de protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar yaşanmıştır. Hepatoma hücrelerinde ise mRNA ifadelerindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı çıkmazken protein seviyesindeki değişikliklerin anlamlı olduğu görülmüştür. ER'dan sitoplazmaya Zn^{2+} geçişini sağlayan Zip7'nin protein ifadesi Hep40 hücrelerinde TPEN uygulamasının ardından artmıştır. ER stresin hepatik hasar oluşumunda ve devamlılığında önemli bir role sahip olduğu ve kanser hücrelerinde ER stresin tümör homeostazisinde etkin rolü olduğu bilinmektedir (111–113). Hep40 hücrelerinde TPEN

uygulamasý sonrası Zip7 ifadesinde artýþ görülmesinin oksidatif stresin yanında hali hazırda hücrelerde bulunan ER stresin de yönetilmesinden kaynaklandığı düþünülmektedir. Kardiyomiyositlerde ER stres oluþturulduėunda, ER'dan çinko salınımının arttığı, Zip7 ve ZnT7'nin aktivitesinin arttığı önceki alıþmalarda gsterilmiþtir (114). Çinko eksikliğinde veya fazlalığında hücrelerin ER stres seviyesinin artmaması için ER, golgi ve vakuoller gibi hücre içi kompartimanlara çinko geiþinin ve/veya ıkıþının sağlanması hücrenin sağlığı için oldukça önemlidir (115). Sitoplazmadan golgi ve ER lümenine çinko alımını sağlayan ZnT7 kanalının protein ifadesi TPEN uygulamasından sonra iki hücre grubunda da artmıþtır. Genel olarak bakıldığında TPEN uygulamasý sonrası hücre içi serbest çinkonun artmasının ardından, Zip ifadelerindeki dþþn ekstrasellüler ortamdan sitoplazmaya çinko alımını indirmek amaçlı olduğu ve ZnT7 ifadesindeki artıþın sitoplazmadaki fazla çinkonun golgiye alınarak dengelenmeye alıþılmasını amaçladığı düþünülmektedir.

Hücre içi çinko artıþının fibroz ve kanser hücreleri üzerindeki etkisini görmek için LX2 ve Hep40 hücrelerinin besi yerine 10 nM ZnPT ve 100 nM ZnCl₂ eklenmiþtir. Alınan hücre içi çinko deėiþim sonuçları incelendiğinde iki hücre hattında da ZnCl₂ uygulamasının daha etkin olduğu görülmektedir (Şekil 5.2). LX2 ve Hep40 hücreleri sağlıklı hücre hatları değillerdir ve bazal çinko seviyelerinin sağlıklı hepatositlere göre çok daha dþk seviyede olduğu bilinmektedir (39,116). Sirotik dokularda ve hepatoma dokularındaki bazal çinko seviyesi sağlıklı karaciğere oranla %55-75 daha dþktr (32). Hücre içi çinkonun artıþına bağlı olarak MTF-1'in aktivasyonunun arttığı ve artan çinkonun dengelenmesi içi baþlangıta MT proteinlerinin ifadesinde artıþ olduğu bilinmektedir. Ancak bazal çinko seviyesi normalden dþk olan hücre gruplarının çinko takviyesine verdikleri yanıtların beklenenden farklı olabileceği düþünülmektedir. ZnCl₂ uygulanan gruplarda MTF-1'in mRNA seviyesi TPEN uygulananlarla kıyaslandığında anlamlı biçimde fazla olduğu görülse de kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı deėiþimler bulunmamaktadır. MTF-1'in regüle ettiği MT1A ve MT2 genlerinin mRNA seviyeleri ZnCl₂'de daha çok olmakla beraber çinko arttırmaya yönelik uygulamaların ardından artmaktadır. Bu durum çinkonun artmasına bağlı olarak MTF-1 aktivasyonunun da artmasından kaynaklandığı Şeklinde yorumlanabilir. MTF-1'in nükleusa geçmesi için çinko parmak motiflerinin satüre olması gerekmektedir, ancak transkripsiyon faktörü olarak iþlev kazanması için fosforile olması Őarttır. COS hücrelerinde yapılmıþ bir alıþmada 20-60 dk arasında 100 uM ZnCl₂ uygulanan hücrelerde MTF-1'in fosforilasyonunun 2-4 kat arası arttığı gsterilmiþtir (117). MTF-1'in aktivasyonunun

çinkoya bağı olarak artmaktadır ancak aktivasyon artışının her zaman mRNA düzeyindeki artışı işaret etmeyeceği düşünülmektedir.

Çizelge 6.1 LX2 ve Hep40 hücrelerinin uygulama gruplarına göre hücre içi Zn²⁺ yoğunlukları (nM)

	Kontrol	TPEN	ZnPT	ZnCl ₂
LX2	0,93	3,55	1,67	1,91
Hep40	1,007	6,36	2,53	3,23

Hücre içi serbest çinko ölçümlerinde Hep40 ve LX2 hücrelerinin kontrol gruplarının çinko miktarlarında oldukça yakın sonuçlar alınmıştır. ZnPT ve ZnCl₂ uygulamalarından sonra kaydedilen artışlar incelendiğinde Hep40 hücrelerinin uygulamalar karşısında daha çok etkilendiği görülmüştür (Çizelge 6.1). Bu durumun kanser hücrelerinin hücre içi çinko miktarlarının düşmesi ile fibrotik hücrelerdeki çinko azlığının aynı hücrel mekanizmalar üzerinden gerçekleşmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (39). HCC hücrelerindeki hücrel çinkonun azalmasının sebebi olarak malignleşen hücrelerin çinko kanal proteinlerinin ifadelerini azaltarak ekstrasellüler ortamdan çinko alımını düşürdükleri daha önce yapılmış çalışmalarda gösterilmiştir (118). Karaciğer fibrozunda ve siroz başlangıcında ise serum çinko seviyesi düşmektedir ancak diğer dokulara kıyasla bu durumdan en çok etkilenenin karaciğer hücreleri olduğu bilinmektedir. Kronik karaciğer hasarı ve siroz durumunda, hepatositlere hepatik portal ve arterden gelen kanın ulaşımını sağlayan sinüsoidal lümende yapısal bozulmalar başladığı için hepatositlere serum yoluyla ulaşabilen çinko miktarında da ciddi anlamda düşüş yaşanmaktadır (119,120). Fibrotik hücrelerde ve karsinoma hücrelerindeki çinko düşüklüğünün sebeplerinin farklı olması, çinko takviyesi uygulandığında hem etkilenme düzeylerinin hem de verdikleri hücrel tepkilerin farklı olmasını açıklayabilecek niteliktedir. Zip ve ZnT çinko kanallarının mRNA ve protein seviyelerindeki değişim incelendiğinde ZnCl₂ uygulamasının ardından gerçekleşen değişikliklerin istatistiksel olarak daha anlamlı ve tutarlıdır. Zip8 ve Zip14 kanalları hücre zarı üzerinde bulunmaktadırlar bu sebeple hücre içi çinko miktarının takviye ile artırılmasının ardından ifadelerinde düşüş görülmesi hücrel Zn²⁺ homeostazisinin sağlanması açısından şaşırtıcı değildir. Zip8 için bu durum tutarlı olsa da alınan sonuçlarda

Zip14'ün ifadesindeki değişikliğin mRNA düzeyinde tam tersi yönde gerçekleşmiştir. Zip14 karaciğer dokusunda çokça çalışılan bir kanal proteindir ve Zip14 ifadesinin HCC hücrelerindeki ifadesinin malignite arttıkça azaldığı immünohistokimya boyamalarıyla da gösterilmiştir (121). Bu çalışmada yapılan immünofloresan boyamalarının sonuçlarında fibrotik ve hepatoma hücrelerine ZnCl₂ uygulaması sonrası Zip14 ifadesi protein düzeyinde LX2 hücrelerinde %30 oranında, Hep40 hücrelerinde %60 oranında azalmıştır. Ancak mRNA düzeyinde, LX2 hücrelerinde 8,8 kat, Hep40 hücrelerinde 2,3 kat artış kaydedilmiştir. İki hücre hattı arasındaki kat farkının fazla olmasının farklı patolojilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hücre içi çinkonun artmasına bağlı olarak MTF-1'in aktif hale gelmesi ile Zip14 transkripsiyonunda artış yaşanmasının mümkün olabileceği ancak hücrelerin çinko homeostazisine bağlı olarak translasyonun farklı şekilde regüle ediliyor olabileceği ihtimaller dahilindedir. Zip7 kanalının fibrotik hücrelerde çinko artışıyla azalma eğiliminin olduğu hem mRNA hem de protein düzeyinde desteklenmektedir. Bu durum artan hücre içi çinko ile ER'dan Zn²⁺ çıkışının düzenlenmesi yönünde verilen bir yanıt olarak nitelenebilir. LX2 hücrelerinde Zip7 aktivitesinde çinko artışına bağlı azalma olduğu fosfo-Zip7 ifadesinde görülen düşüşle de desteklenmiştir (Şekil 5.7). Ancak Hep40 hücrelerinde artan çinkoyla birlikte Zip7'nin mRNA seviyesinde düşüş olduğu görülürken protein seviyesinde anlamlı artışlar kaydedilmiştir. Ek olarak çinko artışı sonrasında fosfo-Zip7 ifadesi artmıştır (Şekil 5.7). Her iki hücre hattında da ZnCl₂ uygulaması sonrası ZnT7 ifadesinin hem mRNA hem de protein düzeyinde arttığı görülmektedir fakat mRNA seviyesindeki artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. ZnT7'nin ifadesinde artış görülmesinin artan intrasellüler çinkoyu dengelemek için gerçekleştiği düşünülmektedir.

HDAC I, II ve IV sınıfları çinko-bağımlı proteinlerden oluşmaktadır. Diğer HDAC'lar gibi HDAC4'ün de DNA'ya bağlanması için yeterli miktarda çinko bağlaması gerekmektedir. HDAC4 ifade baskılayıcı olarak tek başına aktif değildir. Baskılayıcı kompleks içerisindeyken aktif haldedir. Bu kompleksin içerisindeki proteinler hücrenin tipine ve patolojik durumuna göre değişiklik göstermektedir (98). HDAC3 ise HDAC4'ün baskılayıcı özelliğinin işlevsellik kazanması için bu komplekslerde bulunmak zorundadır (122). Bu tez çalışmasında çinkonun fibrozda etkin rolü olan genlerin üzerindeki epigenetik etkisi HDAC4 üzerinden incelenmiştir. Aynı zamanda total HDAC aktivitesine bakılarak çalışılan gen gruplarının mRNA düzeylerindeki değişimlere de bakılmıştır.

Çinko takviyesi ile total HDAC aktivitesi değişimi incelendiğinde fibrotik hücrelerde de kanser hücrelerinde de HDAC aktivitesinde düşüş olduğu görülmektedir. LX2 hücrelerinde ZnCl₂ uygulamasının ardından hücre içi serbest çinko konsantrasyonu 0,93 nM'den 1,91 nM'a yükselmiştir. Bu artışın ardından total HDAC aktivitesinde %30'luk bir azalma yaşanmıştır. Hep40 hücrelerinde ise ZnCl₂ uygulamasından sonra çinko yoğunluğu 1,007 nM'den 3,23 nM'a yükselmiştir. HDAC aktivitesi ise anlamlı olmasa da yaklaşık %20 azalmıştır. İki hücre grubunda da HDAC aktivitesi çinko yoğunluğu arttıkça azalmıştır ve bu durumun incelediğimiz çinko-bağımlı genlere de yansıdığı görülmektedir. İki hücre hattında da MT1A, MT2 ve MMP13 genlerinin mRNA seviyelerinde artan çinko ile artış kaydedilmiştir (Şekil 5.19-20). Son yıllarda yapılan hepatoma ve epigenetik düzenlemeler üzerine yapılan çalışmalarda HDAC aktivitesinin tümör gelişiminde ve yayılımında etkin rolü olduğu gösterilmiştir (123,124). HDAC inhibitörleri HCC tedavisi için umut vaat eden tümör baskılayıcılar olarak görülmektedir (125,126). Hep40 hücrelerine yapılan çinko takviyesi ile birlikte total HDAC aktivitesinde görülen düşüşün ardından çinkonun kanser hücreleri üzerindeki olumlu etkisinin HDAC aktivitesi üzerinden olabileceği ön görülmektedir. HDAC aktivitesinde yaşanan düşüş ile birlikte çalışılan MT proteinlerinin ve MMP13'ün ifadelerinde artış olması birbirini destekleyen sonuçlardır. MMP2 ve MMP2 inhibitörü TIMP2'nin HCC hastalarındaki ifade dengesi üzerine yapılmış bir çalışmada MMP2 ifadesinin metastaz nodüllerinde primer tümöre kıyasla daha fazla olduğu, TIMP2 ifadesinin ise metastazı olan hastalarda çok düşük seviyelerdeyken sirozlu hastalarda fazla olduğu gösterilmiştir (127). Ayrıca HCC hücrelerinde MMP2'nin regülasyonun MMP9 aktivitesi ile düzenlenmektedir, kanser yayılımı MMP9 ve MMP2 ifadesindeki artış ile birlikte artmaktadır (128). Alınan qRT-PCR sonuçlarında MMP2 ifadesinin çinko takviyesinin ardından istatistiksel olarak anlamlı bir değişim kaydedilmemiştir (Şekil 5.20). MMP2 ifadesinin hepatoma hücrelerinde epigenetik düzenlemelerden daha çok MMP9 ve TIMP2 ifadelerindeki değişiklikler gibi daha çok genetik düzenlenmelerden etkileniyor olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

MMP proteinlerinin fibroz oluşumunda ve gelişimindeki etkileri hala aydınlatılamamıştır. 2010 yılında yayımlanmış bir çalışmada hepatik stellat hücrelerinin aktif hale gelerek miyofibroblastlara dönüşürken MMP9 ve MMP13 ifadelerinin HDAC4 aktivitesi ile baskılandığı, bu durumun ESM birikiminin artmasına sebep olarak fibrojenik aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir (129). 2001'de yayımlanan bir çalışmada da sekiz hafta boyunca

CCl₄ enjekte edilerek karaciğer fibrozu olan farelerin enjeksiyon tamamlandıktan sonraki iyileşme periyodunda MMP13 ifadelerinde ciddi bir artış, MMP2 ifadelerinde ise düşüş kaydedilmiştir (130). Ancak 2006 yılında yapılan bir çalışmada MMP ifadesinin artmasının fibrozu tetiklediğin gösteren bulgular sunulmuştur. Safra kanalı bağlanarak karaciğer fibrozu oluşturulan, MMP13 geni düşürülmüş farelerin kullanıldığı bu çalışmada, fibroz oluşumu oldukça azdır, MMP2 ve MMP9 ifadeleri ise çok düşük seviyelerdedir. Ancak MMP13 ifadesi bulunan hayvanlarda fibroz daha agresif ilerlemektedir ve MMP2 ifadesi artmaktadır (131). Grubumuz tarafından yapılan eski bir çalışmada, dört hafta boyunca CCl₄ enjeksiyonu yapılarak karaciğer fibrozu yapılan farelerden alınan karaciğer örnekleri ile aynı yaştaki sağlıklı farelerin kontrol grubu olarak kullanıldığı bir mikrodizin çalışması yapılmıştır. Bunun sonucunda fibrotik karaciğer dokusunda MMP2 ve MMP13 ifadelerinin 6-7 kat arasında arttığı sonucuna ulaşılmıştır (Çizelge 6.2). Elde edilen bu sonucun MMP2 ve MMP13'ün fibroz oluşumunda rol aldığını gösteren çalışmaları desteklediği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında alınan qRT-PCR sonuçlarında ise fibrotik hücrelerde çinko yoğunluğunun artmasıyla birlikte MMP2 ve MMP13 ifadelerinde artış olduğu görülmüştür. Alınan farklı doğrultudaki sonuçların, çalışılan hücrelerin farklı evrelerde olmasından kaynaklanıyor olabilir. Fibrotik model olarak kullanılan LX2 hücreleri, aktif hepatik stellat hücrelerdir ve çinko takviyesinin ardından görülen MMP2 ve MMP13 ifadelerindeki artışın 2010 yılında aktif hale gelen HSH'ler ile yapılmış çalışmanın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. LX2 hücrelerinde fibrotik fenotip kazanılırken HDAC4 aktivitesi ile ifadesi baskılanan MMP2 ve MMP13 genlerinin ifadelerinde ZnCl₂ uygulandıktan sonra görülen artışın çinkonun fibroz üzerindeki olumlu etkisini işaret ettiği düşünülmektedir. Ayrıca bu durum total HDAC aktivitesinin azalmasıyla da desteklenmektedir. Grubumuza ait in vivo mikrodizin sonuçlarında görülen artış 2006 yılında yayımlanan çalışmanın bulgularını desteklemektedir fakat bu mikrodizin çalışmasının farelere yapılacak çinko takviyesinin ardından tekrarlanması, yapılan in vivo deneylerin çinkonun etkisi bağlamında daha verimli yorumlanmasını sağlayacaktır.

Çizelge 6.2 Fibrotik fare karaciğer dokusu ve sağlık fare karaciğer dokusu ile yapılan mikrodizin sonuçları

<i>Gen Adı</i>	<i>Kat Değişimi</i>
<i>MT1A</i>	12,447
<i>MT2</i>	38,745
<i>MMP2</i>	6,3
<i>MMP13</i>	7,2

Artan hücre içi serbest çinko yoğunluğu ile birlikte HDAC4'ün MT1A, MT2, MMP2 ve MMP13 genlerine bağlanmasındaki değişim kromatin immünopresipitasyonu ile incelenmiştir. LX2 hücrelerinde de Hep40 hücrelerinde de artan çinko ile birlikte HDAC4'ün bağlanma yüzdesi artmaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda genlerin baskılanması ve mRNA seviyelerinde düşüş görülmesi gerekirken qRT-PCR sonuçları tam tersini göstermektedir. Çinko artışı ile birlikte HDAC4'ün DNA'ya bağlanmasında görülen artışın, HDAC4'ün aktif kompleks olarak bağlanmıyor olabileceği yönünde değerlendirilebilir. HDAC4'ün baskılayıcı kompleks ile birlikte aktif hale geldiği bilinmektedir.

6.2. SONUÇ

Bu tez çalışmasında karaciğer fibrozu ve karaciğer kanserinde çinko tedavisinin hücresel boyutta etkisi hem genetik hem de epigenetik perspektiften incelemiştir. LX2 ve Hep40 hücre hatlarının kullanıldığı bu çalışmada çinko takviyesi çinko kanal proteinlerinin ifadesini hem mRNA hem de protein düzeyinde etkilemektedir. Hücre içi serbest çinko yoğunluğunun artmasıyla birlikte hücreye ekstrasellüler ortamdan çinko alımını sağlayan Zip8 ve Zip14 kanallarının ifadesinde genel eğilimin azalma yönündedir, ER ve golgi lümeninden sitoplazmaya çinko geçişini sağlayan Zip7'nin aktivitesi ise azalmaktadır. ER ve golgi lümenine çinko alımı yapan ZnT7 kanal ifadesi ise sitoplazmada artan çinko yoğunluğuna paralel olarak artmaktadır. Promotor bölgelerinde MRE konsensüs DNA dizisi bulunan bu kanal proteinlerinin regülasyonundan sorumlu olduğu düşünülen MTF-1'in ifadesinde beklenen çinko takviyesinin ardından beklenen artış mRNA seviyesinde görülmemiştir. Ancak MTF-1 ile birlikte çinko homeostazisinde temel rolü olan MT1A ve

MT2 genlerinde beklenen artışlar yaşanmıştır. Bu durumun MTF-1'in çinko varlığında aktivitesinin artması ancak aktivasyonun mRNA seviyesindeki artışla değil fosforilasyon ile tetikleniyor olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Fibroenez sürecinde ve hepatosellüler karsinoma gelişiminde/yayılımında rol oynayan MMP proteinlerinin ifadesinde artan serbest çinko ile birlikte artış olduğu görülmüştür. Ayrıca bu artış total HDAC aktivitesindeki düşüşle de desteklenmiştir. Bu sonuçlar fibrotik hücreler için literatürdeki in vitro sonuçlarla uyum içerisindedir. Kanser hücrelerinde ise artan çinko ile birlikte total HDAC aktivitesinde düşüş yaşanması çinkonun, potansiyel tümör baskılayıcı olarak değerlendirilen HDAC inhibitörlerine alternatif olarak çalışılabileceği şeklinde yorumlanmıştır. HDAC4'ün MT ve MMP genlerine bağlanması çinko artışıyla birlikte iki hücre tipinde de artmaktadır. Fakat bağlanmadaki artış ve total HDAC aktivitesindeki düşüş ile genlerin mRNA seviyelerinde kaydedilen artış ters düşmektedir. Bu durum, HDAC4'ün DNA'ya bağlanmasının çinko varlığında artmasına rağmen aktif kompleks oluşumunda çinkodan farklı düzenleyicilere ihtiyaç duyuluyor olabileceği yönünde değerlendirilmiştir. Bulgular ışığında, çinko takviyesi ile birlikte fibroz ve kanser hücrelerinden alınan olumlu yanıtın genetik arka planında MTF-1 ve Zip/ZnT kanalları üzerinden gerçekleşiyor olabileceği sonucuna varılmıştır. Epigenetik olaraksa çinko artışı ile azalan total HDAC aktivitesinin HDAC4'ten daha etkin rolü olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada, bazal hücre içi çinko seviyesi düşük olan fibrotik model LX2 ve hepatoma modeli Hep40 hücrelerinin çinko homeostazisinde meydana getirilen değişikliklerin hücreler tarafından hangi yollar üzerinden dengelenmeye çalışıldığı ve bu sürecin anti-fibrotik veya inhibitör etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmanın devamında tamamlanması planlanan ilk hedef sağlıklı hepatosit hattı THLE-3 hücrelerinde de benzer deney setlerini tamamlayarak sağlıklı hepatositler ile fibrotik hücrelerin ve HCC hücrelerinin çinko uygulamalarına verdikleri yanıtların temellendirerek daha ayrıntılı değerlendirilmesidir. Çalışılan genlerin protein ifadelerindeki değişimlerin western blot ve immüno Floresan deneylerine ek olarak akım sitometrisi ile ölçümü yapılacaktır. MMP2 ve MMP13 proteinazlarının mRNA ifadelerine ek olarak çinko uygulaması sonrasında aktivitelerinde görülen muhtemel değişiklikler jelatin zimografi ile incelenecektir. MTF-1 transkripsiyon faktörünün artan çinko konsantrasyonu ile aktivasyonunun artıp artmadığını görebilmek için MTF-1 ile kromatin immünopresipitasyonu yapılacaktır. HDAC4 üzerinden çalışılan epigenetik etki mekanizmasını daha iyi anlayabilmek için HDAC4'ün baskılayıcı

kompleksinin elzem üyesi HDAC3 ile de kromatin immünopresipitasyonu yapılacaktır. 2018 yılında yayımlanan bir çalışmada yenidoğan fibroblast hücre hattı BJ1 (insan) kullanılarak üretilen iPS hücrelerinin fonksiyonelliği ve fenotipi insan HSH'ne benzeyen hücrelere farklılaştırılabildiği gösterilmiştir (132). Çinkonun siroz-fibroz-HCC prognozundaki rolünün daha sağlıklı çalışılabilmesi için ilerleyen çalışmalarımızda model hücre olarak indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPS) kullanılarak HSH'i üretilmesi ve kullanılması planlanmaktadır.



KAYNAKLAR

1. Grijalva J, Vakili K. Neonatal liver physiology. *Semin Pediatr Surg* [Internet]. 2013;22(4):185–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2013.10.006>
2. Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. DISTRIBUTION OF ORGANELLES AND MEMBRANES BETWEEN HEPATOCYTES AND NONHEPATOCYTES IN THE RAT LIVER PARENCHYMA-A Stereological Study. *J Cell Biol.* 1977;72(2):441–55.
3. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and Development of the Liver. *Dev Cell.* 2010;18(2):175–89.
4. Pradere J-P, Kluwe J, De Minicis S, Jiao J-J, Gwak G-Y, Dapito DH, et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology.* 2013 Oct;58(4):1461–73.
5. Manuscript A, Inflammation H. Hepatic Inflammation and Fibrosis: Functional Links and Key Pathways. 2016;61(3):1066–79.
6. Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology.* 2006 Feb;130(2):435–52.
7. Kmiec Z. Cooperation of Liver Cells in Health and Disease [Internet]. Vol. 161. 2001. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-56553-3>
8. Arthur MJ. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. *Pathol Res Pract.* 1994 Oct;190(9–10):825–33.
9. Friedman SL. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2247–50.

10. Bataller R, Brenner D. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209–18.
11. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2004 Dec;1(2):98–105.
12. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008 Aug;134(4):657–67.
13. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008 May;134(6):1655–69.
14. Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008 Feb;233(2):109–22.
15. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology*. 2002 Oct;36(4 Pt 1):850–60.
16. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*. 1997 Oct;74(2):111–22.
17. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar;1477(1–2):267–83.
18. Kisseleva T, Brenner DA. Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011 Apr;25(2):305–17.
19. Iwata K, Enomoto H, Nishiguchi S, Aizawa N, Sakai Y, Iwata Y, et al. Serum zinc value in patients with hepatitis virus-related chronic liver disease: association with the histological degree of liver fibrosis and with the severity of varices in compensated cirrhosis. Vol. 55, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. Kyoto, Japan; 2014. p. 147–52.

20. Bode JC, Hanisch P, Henning H, Koenig W, Richter FW, Bode C. Hepatic zinc content in patients with various stages of alcoholic liver disease and in patients with chronic active and chronic persistent hepatitis. *Hepatology*. 1988;8(6):1605–9.
21. Milman N, Laursen J, Podenphant J, Asnaes S. Trace elements in normal and cirrhotic human liver tissue. I. Iron, copper, zinc, selenium, manganese, titanium and lead measured by X-ray fluorescence spectrometry. *Liver*. 1986 Apr;6(2):111–7.
22. Mohammad MK, Zhou Z, Cave M, Barve A, McClain CJ. Zinc and liver disease. *Nutr Clin Pract*. 2012 Feb;27(1):8–20.
23. Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology*. 2010 Apr;51(4):1445–9.
24. Lanthier N. Haemopoietic stem cell therapy in cirrhosis: the end of the story? *Lancet Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018 Jan 1;3(1):3–5. Available from: [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30359-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30359-X)
25. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 2006 Sep;6(9):674–87.
26. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*. 2007 Feb;27(1):55–76.
27. Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J cancer*. 2007 Apr;120(7):1444–50.
28. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang H-Y, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*. 2009 Mar;136(3):1012–24.
29. Chiba T, Kita K, Zheng Y-W, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties.

- Hepatology. 2006 Jul;44(1):240–51.
30. Ebara M, Fukuda H, Hatano R, Saisho H, Nagato Y, Suzuki K, et al. Relationship between copper, zinc and metallothionein in hepatocellular carcinoma and its surrounding liver parenchyma. *J Hepatol*. 2000 Sep;33(3):415–22.
 31. Danielsen A, Steinnes E. A study of some selected trace elements in normal and cancerous tissue by neutron activation analysis. *J Nucl Med*. 1970 Jun;11(6):260–4.
 32. Kew MC, Mallett RC. Hepatic zinc concentrations in primary cancer of the liver. *Br J Cancer*. 1974 Jan;29(1):80–3.
 33. Liaw KY, Lee PH, Wu FC, Tsai JS, Lin-Shiau SY. Zinc, copper, and superoxide dismutase in hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 1997 Dec;92(12):2260–3.
 34. Teoh NC. Proliferative drive and liver carcinogenesis: too much of a good thing? *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Dec;24(12):1817–25.
 35. Costello LC, Franklin RB. Cytotoxic/tumor suppressor role of zinc for the treatment of cancer: an enigma and an opportunity. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012 Jan;12(1):121–8.
 36. Franklin RB, Costello LC. Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. *Arch Biochem Biophys*. 2007 Jul;463(2):211–7.
 37. Feng P, Li T-L, Guan Z-X, Franklin RB, Costello LC. Direct effect of zinc on mitochondrial apoptogenesis in prostate cells. *Prostate*. 2002 Sep;52(4):311–8.
 38. Feng P, Li T, Guan Z, Franklin RB, Costello LC. The Involvement of Bax in Zinc-Induced Mitochondrial Apoptogenesis in Malignant Prostate Cells. *Mol Cancer* [Internet]. 2008 Mar 10;7:25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2329666/>
 39. Costello LC, Franklin RB. The status of zinc in the development of hepatocellular cancer. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2014;15(4):353–60. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24448510><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3979811><http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cbt.27633>

40. MJ J. Zinc in Human Biology. Springer; 1989.
41. Macdonald RS. Zinc and Health : Current Status and Future Directions The Role of Zinc in Growth and Cell Proliferation 1 , 2. 2000;1500–8.
42. Umeta M, West CE, Haidar J, Deurenberg P, Hautvast JG. Zinc supplementation and stunted infants in Ethiopia: a randomised controlled trial. *Lancet* (London, England). 2000 Jun;355(9220):2021–6.
43. Maret W, Li Y. Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev*. 2009;109(10):4682–707.
44. Fukada T, Kambe T. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics*. 2011;3(7):662–74.
45. Reyes JG. Zinc transport in mammalian cells. *Am J Physiol*. 1996;270(13):C401–10.
46. Haase H. Zinc Signals and Immune Function. *Mol Genet Nutr Asp Major Trace Miner*. 2016;261–71.
47. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. Vol. 73, *Physiological reviews*. 1993. 79-118 p.
48. Little PJ, Bhattacharya R, Moreyra AE, Korichneva IL. Zinc and cardiovascular disease. *Nutrition* [Internet]. 2010;26(11–12):1050–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2010.03.007>
49. Lichten LA, Cousins RJ. Mammalian Zinc Transporters: Nutritional and Physiologic Regulation. *Annu Rev Nutr* [Internet]. 2009;29(1):153–76. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-nutr-033009-083312>
50. Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases. *J Biol Inorg Chem*. 2011;16(7):1123–34.

51. Kimura T, Kambe T. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters : An Overview and Perspective. 2016;(Figure 1):10–2.
52. Vasák M, Hasler DW. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol.* 2000;4(2):177–83.
53. Taylor KM, Hiscox S, Nicholson RI, Hogstrand C, Kille P. Protein kinase CK2 triggers cytosolic zinc signaling pathways by phosphorylation of zinc channel ZIP7. *Sci Signal.* 2012 Feb;5(210):ra11.
54. Sensi SL, Ton-That D, Sullivan PG, Jonas EA, Gee KR, Kaczmarek LK, et al. Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn²⁺ pools. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May;100(10):6157–62.
55. Stork CJ, Li Y V. Rising zinc: a significant cause of ischemic neuronal death in the CA1 region of rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009 Aug;29(8):1399–408.
56. Vasak M, Meloni G. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem.* 2011 Oct;16(7):1067–78.
57. Lazo JS, Kondo Y, Dellapiazza D, Michalska AE, Choo KH, Pitt BR. Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *J Biol Chem.* 1995 Mar;270(10):5506–10.
58. Krężel A, Maret W. Thionein/metallothionein control Zn(II) availability and the activity of enzymes. *JBIC J Biol Inorg Chem [Internet].* 2008;13(3):401–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0330-y>
59. Pinter TBJ, Stillman MJ. Kinetics of Zinc and Cadmium Exchanges between Metallothionein and Carbonic Anhydrase. *Biochemistry.* 2015 Oct;54(40):6284–93.
60. Zenl J, Heuchel R, Schaffner W. Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp i. *1991;79391(21):21–3.*

61. Zeng JIN. Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters. 1991;88(November):9984–8.
62. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V. Induction , Regulation , Degradation , and Biological Significance of Mammalian Metallothioneins. 2000;35(1):35–70.
63. Guerinot M Lou. The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2000;1465(1):190–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527360001383>
64. Gaither LA, Eide DJ. The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J Biol Chem*. 2001 Jun;276(25):22258–64.
65. Eide DJ. The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):796–800.
66. Taylor KM, Nicholson RI. The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Apr;1611(1–2):16–30.
67. Dufner-Beattie J, Huang ZL, Geiser J, Xu W, Andrews GK. Mouse ZIP1 and ZIP3 genes together are essential for adaptation to dietary zinc deficiency during pregnancy. *Genesis*. 2006 May;44(5):239–51.
68. Cao J, Bobo JA, Liuzzi JP, Cousins RJ. Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2001 Oct;70(4):559–66.
69. Wang K, Zhou B, Kuo Y-M, Zemansky J, Gitschier J. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet*. 2002 Jul;71(1):66–73.
70. Dufner-Beattie J, Kuo Y-M, Gitschier J, Andrews GK. The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5. *J Biol Chem*. 2004 Nov;279(47):49082–90.

71. Manning DL, Daly RJ, Lord PG, Kelly KF, Green CD. Effects of oestrogen on the expression of a 4.4 kb mRNA in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Mol Cell Endocrinol.* 1988 Oct;59(3):205–12.
72. Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol.* 1997 Mar;181(3):257–66.
73. Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, et al. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. 2005;102(19).
74. Liuzzi JP, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:151–72.
75. Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. Vol. 14, *The EMBO Journal.* 1995. p. 639–49.
76. Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J Nutr.* 2001 Jan;131(1):46–52.
77. Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem.* 2000;275(44):34803–9.
78. Perez-Clausell J, Danscher G. Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study. *Brain Res.* 1985 Jun;337(1):91–8.
79. Frederickson CJ, Moncrieff DW. Zinc-containing neurons. *Biol Signals.* 1994;3(3):127–39.
80. Michalczyk A, Varigos G, Catto-Smith A, Blomeley RC, Ackland ML. Analysis of zinc transporter, hZnT4 (Slc30A4), gene expression in a mammary gland disorder leading to reduced zinc secretion into milk. *Hum Genet.* 2003 Aug;113(3):202–10.
81. Huang L, Gitschier J. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal

- milk mouse. *Nat Genet* [Internet]. 1997 Nov 1;17:292. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng1197-292>
82. Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, et al. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*. 2002 May;277(21):19049–55.
 83. Huang L, Kirschke CP, Gitschier J. Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J Biol Chem*. 2002 Jul;277(29):26389–95.
 84. Kirschke CP, Huang L. ZnT7 , a Novel Mammalian Zinc Transporter , Accumulates Zinc in the Golgi Apparatus *. 2003;278(6):4096–102.
 85. Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes*. 2004 Sep;53(9):2330–7.
 86. Staiger H, Machicao F, Stefan N, Tschritter O, Thamer C, Kantartzis K, et al. Polymorphisms within novel risk loci for type 2 diabetes determine beta-cell function. *PLoS One*. 2007 Sep;2(9):e832.
 87. Sim DL, Chow VT. The novel human HUEL (C4orf1) gene maps to chromosome 4p12-p13 and encodes a nuclear protein containing the nuclear receptor interaction motif. *Genomics*. 1999 Jul;59(2):224–33.
 88. Perez Y, Shorer Z, Liani-Leibson K, Chabosseu P, Kadir R, Volodarsky M, et al. SLC30A9 mutation affecting intracellular zinc homeostasis causes a novel cerebro-renal syndrome. *Brain*. 2017 Apr;140(4):928–39.
 89. Seve M, Chimienti F, Devergnas S, Favier A. In silico identification and expression of SLC30 family genes: An expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. Vol. 5, *BMC genomics*. 2004. 32 p.
 90. Bosomworth HJ, Thornton JK, Coneyworth LJ, Ford D, Valentine RA. Efflux

- function, tissue-specific expression and intracellular trafficking of the Zn transporter ZnT10 indicate roles in adult Zn homeostasis. *Metallomics*. 2012 Aug;4(8):771–9.
91. Ren Y, Smith A. Mechanism of metallothionein gene regulation by heme-hemopexin. Roles of protein kinase C, reactive oxygen species, and cis-acting elements. *J Biol Chem*. 1995 Oct;270(41):23988–95.
 92. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2016;17(8):487–500. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.59>
 93. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 2007;128(4):693–705.
 94. Li B, Carey M, Workman JL. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell*. 2007;128(4):707–19.
 95. Cheung WL, Briggs SD, Allis CD. Acetylation and chromosomal functions. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12(3):326–33.
 96. Fukuda S, Taga T. Cell fate determination regulated by a transcriptional signal network in the developing mouse brain. *Anat Sci Int / Japanese Assoc Anat* [Internet]. 2005;80(1):12–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve∓dopt=AbstractPlus&list_uids=15794126
 97. Guenther MG, Barak O, Lazar MA. The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol*. 2001 Sep;21(18):6091–101.
 98. Wang, Z., Qin, G., & Zhao TC. Histone Deacetylase 4 (HDAC4): Mechanism of Regulations and Biological Functions. *Epigenomics*. 2015;6(1):139–50.
 99. Wang AH, Kruhlak MJ, Wu J, Bertos NR, Vezmar M, Posner BI, et al. Regulation of histone deacetylase 4 by binding of 14-3-3 proteins. *Mol Cell Biol*. 2000 Sep;20(18):6904–12.

100. Paroni G, Cernotta N, Dello Russo C, Gallinari P, Pallaoro M, Foti C, et al. PP2A regulates HDAC4 nuclear import. *Mol Biol Cell*. 2008 Feb;19(2):655–67.
101. Weiskirchen R, Weimer J, Meurer SK, Kron A, Seipel B, Vater I, et al. Genetic Characteristics of the Human Hepatic Stellate Cell Line LX-2. *PLoS One*. 2013;8(10).
102. Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O’Byrne SM, Blaner WS, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: New tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*. 2005;54(1):142–51.
103. Geerts A. History, Heterogeneity, Developmental Biology, and Functions of Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Semin Liver Dis*. 2001;21.
104. Simon D. Integration of Hepatitis B Virus and Alteration of the lp36 Region Found in Cancerous Tissue of Primary Hepatocellular Carcinoma With Viral Replication Evidenced Only in Noncancerous , Cirrhotic Tissue. 1995;1–6.
105. Guo G-H, Tan D-M, Zhu P-A, Liu F. Hepatitis B virus X protein promotes proliferation and upregulates TGF-beta1 and CTGF in human hepatic stellate cell line, LX-2. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2009 Feb;8(1):59–64.
106. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet* [Internet]. 2014;383(9930):1749–61. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60121-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60121-5)
107. Li MS, Adesina SE, Ellis CL, Gooch JL, Hoover RS, Williams CR. NADPH oxidase-2 mediates zinc deficiency-induced oxidative stress and kidney damage. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017 Jan;312(1):C47–55.
108. Matsunaga Y, Kawai Y, Kohda Y, Gemba M. Involvement of activation of NADPH oxidase and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in renal cell injury induced by zinc. *J Toxicol Sci*. 2005 May;30(2):135–44.
109. Marreiro D, Cruz K, Morais J, Beserra J, Severo J, de Oliveira A. Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. *Antioxidants* [Internet]. 2017;6(2):24. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-3921/6/2/24>

110. Günther V, Lindert U, Schaffner W. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2012;1823(9):1416–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.005>
111. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol*. 2011 Apr;54(4):795–809.
112. Yadav RK, Chae S-W, Kim H-R, Chae HJ. Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer. *J Cancer Prev* [Internet]. 2014;19(2):75–88. Available from: <http://www.jcpjournal.org/journal/DOIx.php?id=10.15430/JCP.2014.19.2.75>
113. Lake AD, Novak P, Hardwick RN, Flores-Keown B, Zhao F, Klimecki WT, et al. The adaptive endoplasmic reticulum stress response to lipotoxicity in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Sci*. 2014 Jan;137(1):26–35.
114. Tuncay E, Bitirim VC, Durak A, Carrat GRJ, Taylor KM, Rutter GA, et al. Hyperglycemia-Induced Changes in ZIP7 and ZnT7 Expression Cause Zn(2+) Release From the Sarco(endoplasmic Reticulum and Mediate ER Stress in the Heart. *Diabetes*. 2017 May;66(5):1346–58.
115. Choi S, Hu YM, Corkins ME, Palmer AE, Bird AJ. Zinc transporters belonging to the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family have complementary roles in transporting zinc out of the cytosol. *PLoS Genet*. 2018;14(3):1–23.
116. Al-Ebraheem A, Farquharson MJ, Ryan E. The evaluation of biologically important trace metals in liver, kidney and breast tissue. *Appl Radiat Isot*. 2009;67(3):470–4.
117. LaRochelle O, Gagné V, Charron J, Soh JW, Séguin C. Phosphorylation Is Involved in the Activation of Metal-regulatory Transcription Factor I in Response to Metal Ions. *J Biol Chem*. 2001;276(45):41879–88.
118. Liu Y, Zhu X, Zhu J, Liao S, Tang Q, Liu K, et al. Identification of differential expression of genes in hepatocellular carcinoma by suppression subtractive hybridization combined cDNA microarray. *Oncol Rep*. 2007;18(4):943–51.
119. Reichen J. The Role of the Sinusoidal Endothelium in Liver Function. *News Physiol*

- Sci an Int J Physiol Prod jointly by Int Union Physiol Sci Am Physiol Soc. 1999 Jun;14:117–21.
120. Keeling PW, Ruse W, Bull J, Hannigan B, Thompson RP. Direct measurement of the hepatointestinal extraction of zinc in cirrhosis and hepatitis. *Clin Sci (Lond)*. 1981 Oct;61(4):441–4.
 121. Franklin RB, Levy BA, Zou J, Hanna N, Desouki MM, Bagasra O, et al. ZIP14 zinc transporter downregulation and zinc depletion in the development and progression of hepatocellular cancer. *J Gastrointest Cancer*. 2012;43(2):249–57.
 122. Di Giorgio E, Brancolini C. Regulation of class IIa HDAC activities: It is not only matter of subcellular localization. *Epigenomics*. 2016;8(2):251–69.
 123. Coradini D, Speranza A. Invited review Histone deacetylase inhibitors for treatment of hepatocellular carcinoma. 2005;26(9):1025–33.
 124. Carcinoma H, Liu K, Wang L, Hsu S. Modification of Epigenetic Histone Acetylation in. 2018;(Stage D):1–13.
 125. Sun G, Mackey L V, Coy DH, Yu C, Sun L. The Histone Deacetylase Inhibitor Vapric Acid Induces Cell Growth Arrest in Hepatocellular Carcinoma Cells via Suppressing Notch Signaling. 2015;6(7).
 126. Zhang X, Xiong G, Zhou Y, Shen X, Sheng H, Gao H. Expression of HDAC4 in hepatocellular carcinoma and its correlation with prognosis. 2016;9(11):12171–7.
 127. Chiraldi OS, Ntonaci SA. CLINICAL ROLE OF MMP-2 / TIMP-2 IMBALANCE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA. 2002;431(June 2001):425–31.
 128. Chen R, Cui J, Xu C, Xue T. The Significance of MMP-9 Over MMP-2 in HCC Invasiveness and Recurrence of Hepatocellular Carcinoma After Curative Resection. 2012;7–16.
 129. Qin L, Han Y-P. Epigenetic Repression of Matrix Metalloproteinases in Myofibroblastic Hepatic Stellate Cells through Histone Deacetylases 4. *Am J Pathol*

[Internet]. 2010;177(4):1915–28. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010602428>

130. Watanabe T, Niioka M, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, et al. Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. 2001;35:465–73.
131. Uchinami H, Seki E, Brenner DA, D’Armiento J. Loss of MMP 13 attenuates murine hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *Hepatology*. 2006;44(2):420–9.
132. Coll M, Perea L, Boon R, Leite SB, Vallverdú J, Mannaerts I, et al. Generation of Hepatic Stellate Cells from Human Pluripotent Stem Cells Enables In Vitro Modeling of Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell*. 2018;23(1):101–113.e7.

EKLER

Ek 1: Kullanılan Standart Solüsyonların Tarifleri

DEPC'li ddH₂O

1ml DEPC

1lt ddH₂O

ddH₂O'ya DEPC eklendikten sonra 1 saat boyunca çeker ocağın altında manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Sonrasında DEPC'yi inaktif hale getirmek için otoklav yapılır.

10x PBS

80 g NaCl

2 g KCl

8,01g Na₂HPO₄.2H₂O

2g KH₂PO₄

1 litre ddH₂O pH: 7,2

Kullanılan 1X PBS solüsyonu, 10X PBS'ten seyreltilerek hazırlanmıştır.

50X TAE Buffer

2M Tris Bazı (242 g)

57,1 ml Glacial Asetik Asit

50mM EDTA

1 litre ddH₂O ile tamamlanır

Kullanılan 1X TAE tamponu 50X TAE tampon çözeltisinden seyreltilerek kullanılmıştır.

10 X Agaroz jel yükleme boyası

0,009g BFB

0,009g XC

2,8mL ddH₂O

1,2ml 0,5M EDTA.

Son hacim gliserol eklenerek 15 mL'e tamamlanmıştır. Jel elektroforezide kullanılmadan önce 1:10 seyreltilerek kullanılmıştır.

10% SDS

100g SDS

1lt ddH₂O

1M Tris

60.55g Tris

300ml ddH₂O

21ml %37 HCl

pH 8.0'a HCl eklenerek ayarlanmıştır, son hacim 500mL'e ddH₂O ile tamamlanmıştır.

0.5M EDTA

93.05g EDTA

300ml ddH₂O

pH 8.0'a NaOH eklenerek ayarlanmıştır, son hacim 500mL'e ddH₂O ile tamamlanmıştır.

Liziz Tamponu

2M NaCl

1M Tris pH:8.2

0.9% Igepal CA-630 (Sigma, Germany)

10x Proteaz Inhibitör Kokteyli (Roche, Germany)

778.5µl ddH₂O

10X TBS

12.19 g Tris

87,76 g NaCl

pH 8'e ayarlanmıştır, son hacim ddH₂O eklenerek 1 litreye tamamlanmıştır.

1X TBS-T 0.3%

50 ml 10X TBS

450 ml ddH₂O

300uL Tween-20

Son hacim ddH₂O eklenerek 500 mL'e tamamlanmıştır

Western Blot için bloklama solüsyonu (5%)

2,5 g BSA

50mL 1X TBS-T (0.3%)

Kırma Tamponu (2X Protein Yükleme Tamponu)

50mM Tris HCl pH: 6.8

2mM EDTA pH: 6,8

1% SDS

20% Gliserol

0,02% BFB

1% β -merkaptoetanol

Komassi Mavisi Boyama Solüsyonu

0,25 g Komassi mavisi tozu

45 ml metanol

45 ml ddH₂O

10 ml Glisial asetik asit

5X Koşturma Tamponu

15 g Tris bazı

72 g Glisin

5 g SDS

1 litre ddH₂O

Kullanılmadan önce 1X'e seyreltilmiştir.

Boya Sökme Solüsyonu

100 ml metanol

35 ml asetik asit

365 ml ddH₂O

Ek 2: Kullanılan Hücre Hatlarının Özellikleri

LX2

Tür: İnsan (*Homo sapiens*)

Hücre tipi: *Karaciğer stellat hücresi*

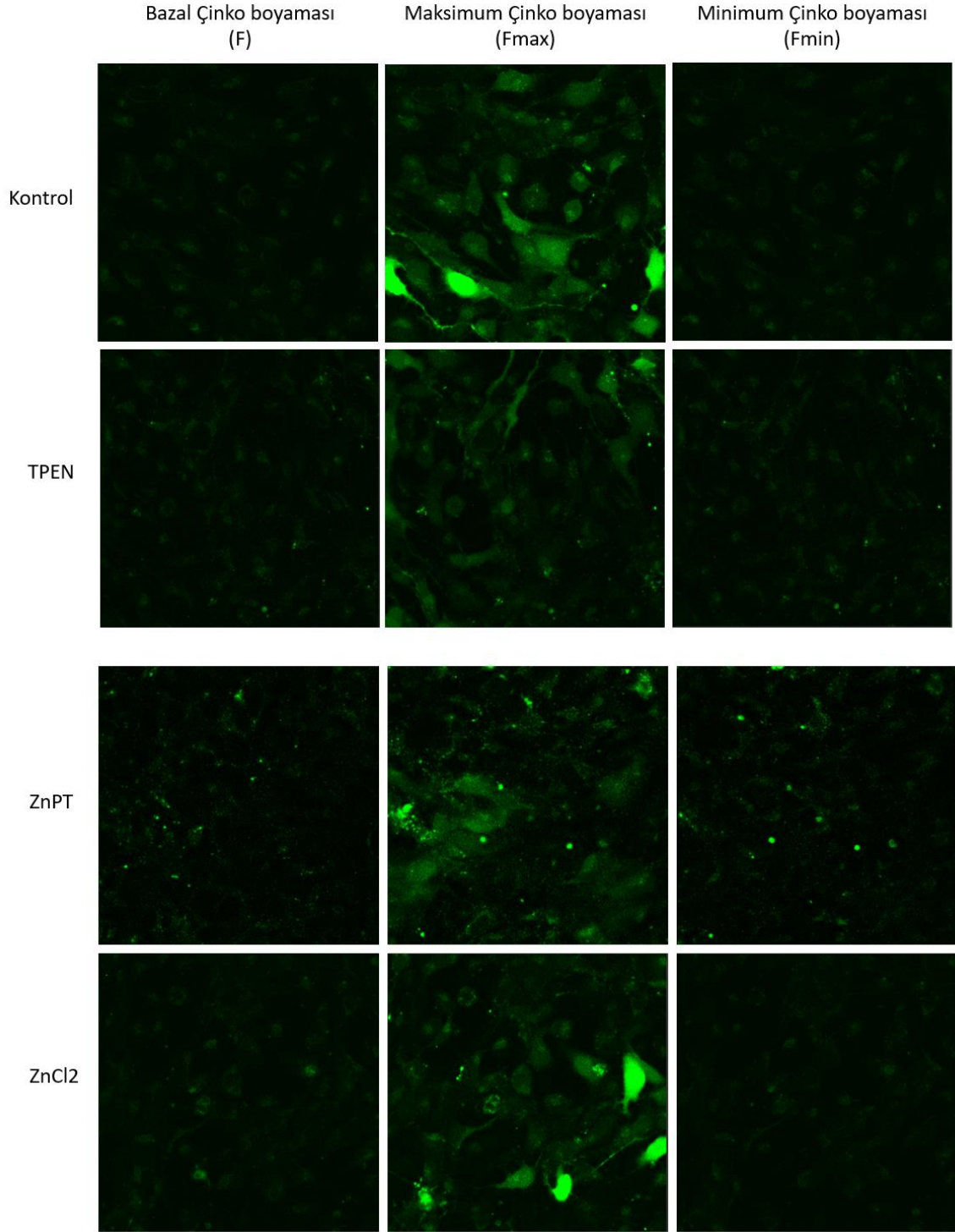
HEP40

Tür: İnsan (*Homo sapiens*)

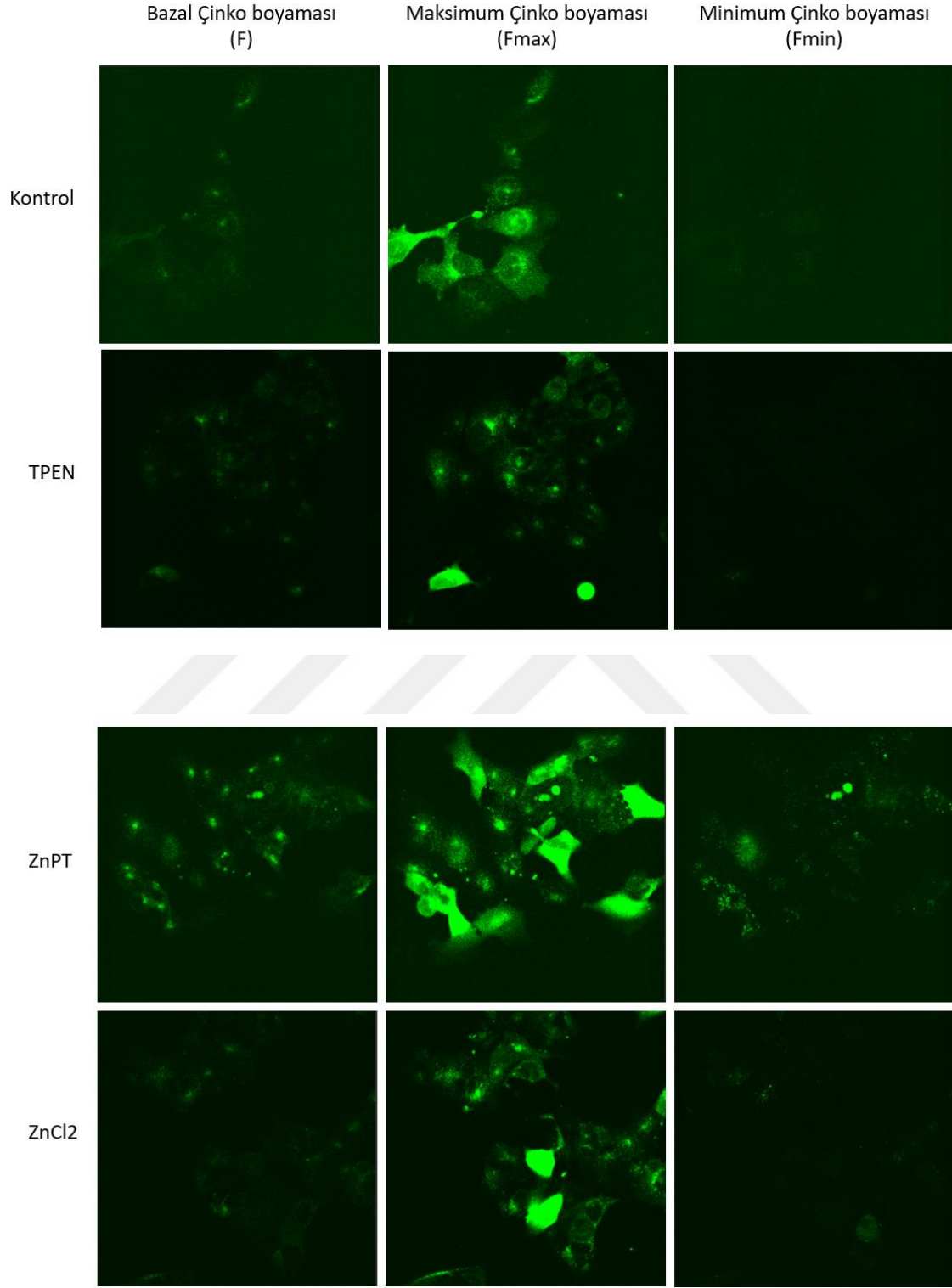
Hücre tipi: *Hepatoselüler karsinoma*



Ek 3: LX2 hücrelerinde Hücre İçi Çinkonun Konfokal İle Ölçüm Görüntüleri

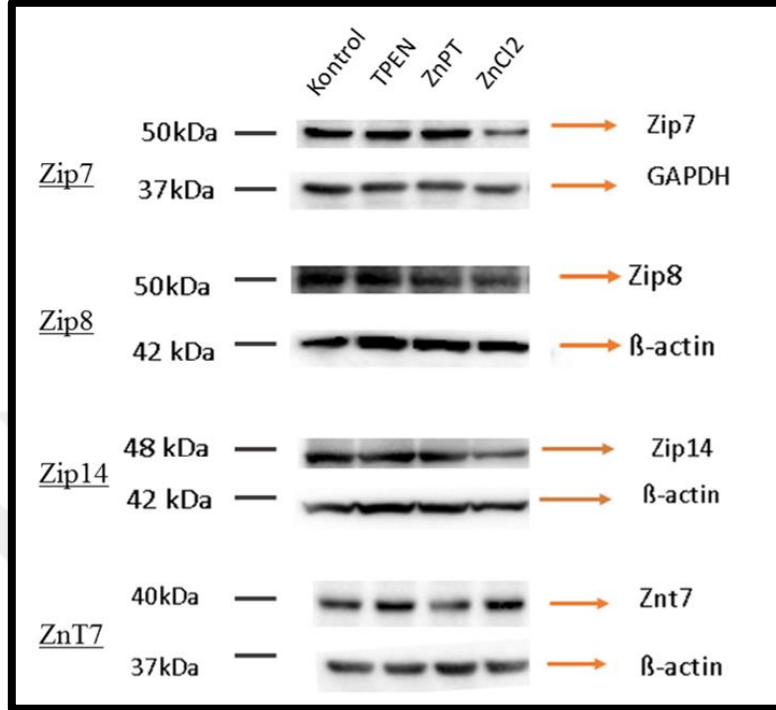


Ek 4: Hep40 hücrelerinde Hücre İçi Çinkonun Konfokal İle Ölçüm Görüntüleri

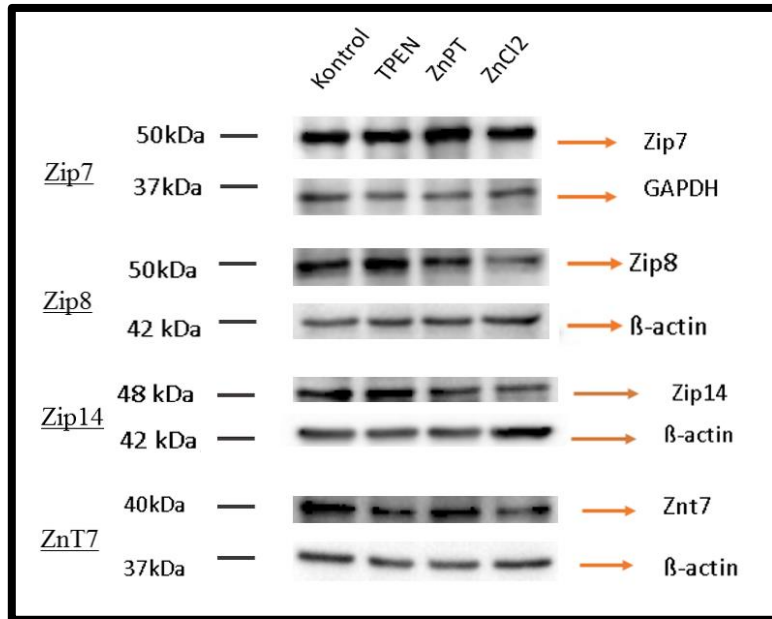


Ek-5

LX2 hücrelerinde Zip7, Zip8, Zip14 ve ZnT7 kanal proteinleri için yapılan western blot deneylerinin representatif bant görüntüleri.



Hep40 hücrelerinde Zip7, Zip8, Zip14 ve ZnT7 kanal proteinleri için yapılan western blot deneylerinin representatif bant görüntüleri.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Zeynep Büşra Aksoy

Doğum Yeri: Erzurum

Doğum Tarihi: 14.10.1992

Medeni Hali: Bekâr

Yabancı Dili: İngilizce, İtalyanca (başlangıç seviyesinde)

Eğitim Durumu

Lise: Antalya Hacı Malike Mehmet Bileydi Anadolu Lisesi (2006-2010)

Lisans: Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik (2010-2015)

Yayınlar ve Bildiriler

Ulusal yayınlar:

- “Lizozomal Aktivite”, Güncel Gastroenteroloji, Aralık 2016, vol. 20.4
- “Polimorfizm”, Güncel Gastroenteroloji, Mart 2017, vol.21.1
- “Rekombinant DNA Teknolojisi ve Günümüzdeki Kullanımı” Güncel Gastroenteroloji, Mart 2017, vol.21.1
- “P Tipi ATPazlar: H⁺/K⁺ ATPaz Proteini ve Na⁺/K⁺ ATPaz Proteini”, Güncel Gastroenteroloji, Aralık 2016, vol. 20.4

Poster Sunumları:

- “Mezenkimal Kök Hücre Farklılaşmasında Östrojenin Epigenetik Etkisi”, Molbiyokon 2018, İzmir.
- “Çinkonun Karaciğer Fibrozu Üzerindeki Genetik Ve Epigenetik Etkisi”, ILC 2019, EASL, Viyana. *Yüklendi.*

İş Tecrübesi

Kurumu: TUBİTAK 115S335 “*Aday miRNA’ların Karaciğer Fibrozundaki Etkilerinin Hepatik Stellat Hücrelerde Araştırılması*”

Görevi: Proje Bursiyeri

Yılları: Kasım 2015-Nisan 2016

Kurumu: TUBİTAK 213S130 “*Hepatit B, C ve Delta Virüslerinin Moleküler Tanılarında Kullanılan Yöntemler için Kalite Kontrol Serumlarının ve Ulusal Kalite Kontrol Programlarının Geliştirilmesi*”

Görevi: Proje Bursiyeri

Yılları: Mayıs 2016-Kasım 2016

Kurumu: TUBİTAK 117S057 “*Çinkonun karaciğer fibrozu oluşumu ve gerilemesinde genetik ve epigenetik rolü*”

Görevi: Proje Bursiyeri

Yılları: 2018-

PT 002

**Epigenetic Effect of Estrogen on the Differentiation of
Mesenchymal Stem Cell**

Zeynep B. Aksoy,^{1,2} C. Verda Bitirim,¹ K. Can Akcali,¹

1 *Ankara University Stem Cell Institute, Ankara, Turkey*

2 *Ankara University Institute of Biotechnology, Ankara, Turkey*

Corresponding author: can.akcali@ankara.edu.tr

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a group of adult stem cells. MSCs are multipotent and in a specific condition, like the presence/absence of estrogen, tend to differentiate in one type of cell line including osteocytes and adipocytes. Estrogen deficiency is considered as major cause of osteoporosis, osteoarthritis and obesity in postmenopausal women. However, this estrogen-dependent switch mechanism between osteogenesis and adipogenesis are not epigenetically explained. Previously, we have shown estrogen treatment decreased the expression of major adipogenic transcription factors, C/EBP α , FABP4, PPAR γ , Adipsin while increasing key osteogenic transcription factor RUNX2 in MSCs. Here, we report that, estrogen epigenetically regulate the adipogenic and osteogenic transcription factors via ER α . Using Co-IP assay, we identified protein-protein interactions between ER α and histone methyltransferases, EZH2 and Set7/9, and H3K4me3 which is Set7/9 histone methyltransferase's modification, suggesting that ER α may promote the recruitment of H3K4me2/3 in order to modulate histone modifications on transcription factors involved in differentiation. Through this pathway, estrogen leads and regulates the MSC differentiation epigenetically

Keywords: Mesenchymal stem cell, Estrogen, Epigenetics, Osteogenesis